

**Inaktivierung von mRNAs und miRNAs durch
DNA/LNA-basierte und mit zusätzlichen
Funktionalitäten konjugierte Antisense-
Oligonukleotide**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Laura Thomas
aus **Bad Kreuznach**

Marburg (Lahn) 2020

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Erstgutachter: **Prof. Dr. Roland K. Hartmann**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Michael W. Göbel**

Eingereicht am **09.06.2020**

Tag der mündlichen Prüfung am **07.08.2020**

Hochschulkennziffer: 1180

Zusammenfassung

Seit der Entdeckung der RNA Interferenz (RNAi) Ende der 90er Jahre wurde dieser Mechanismus als gentechnisches Werkzeug stetig weiterentwickelt und in den verschiedensten biologischen sowie medizinischen Bereichen eingesetzt. Dies ermöglichte nicht nur die Aufklärung unbekannter Gen-Funktionen durch Knockdown-Experimente, sondern auch die Entwicklung RNA-Interferenz-basierter Therapeutika. Hierbei stellt vor allem der Einsatz kurzer, nicht kodierender RNAs, welche die Genexpression mit Hilfe von RNAi beeinflussen können, eine vielversprechende Therapieoption dar. Sogenannte microRNAs (miRNAs) können einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation unzähliger biologische Prozesse nehmen. Durch diese Beeinflussung, welche auch die Differenzierung und Proliferation von Zellen betreffen kann, können sie tumorsuppressive wie auch onkogene Eigenschaften besitzen. Neben den natürlich vorkommenden miRNAs wurde als Therapieansatz und zur gentechnischen Analyse ebenfalls synthetische kleine RNAs entwickelt, wie z.B. die *small interfering RNAs* (siRNAs). Dies ermöglichte es stabilere und modifizierte RNAs einzusetzen, was den Anwendungsbereich erweiterte sowie neue Therapiealternativen ermöglichte.

Im ersten Projekt dieser Arbeit wurde untersucht, ob RISC-Komplexe an eine spezifische mRNA mit Hilfe eines bifunktionellen Adapter-Oligonukleotids umgeleitet werden können. Durch diesen Ansatz ist es möglich eine onkogene miRNA in ihrer Funktion zu inhibieren und gleichzeitig die Translation der mRNA eines Proto-Onkogens zu supprimieren und dadurch simultan einen synergistischen antitumorigenen Effekt zu erreichen. Dabei adressiert ein Teil des Adapters die onkogene miRNA, welche zuvor von einem RISC-Komplex gebunden wurde. Der zweite Adapter-Bereich ist gegen die 3'-UTR einer spezifischen mRNA adressiert und ermöglicht es so, den indirekt gebundenen RISC-Komplex zur mRNA umzuleiten und den Abbau dieser zu induzieren. Dieser Ansatz wurde zu Beginn der Untersuchungen bei dem Proto-Onkogen PIM1 und der onkogenen miR-20a, die die Proteinexpression des Zellzyklusregulators und Tumorsuppressors P21 herunterreguliert, analysiert. Es konnte mit Hilfe von *in vitro* Analysen gezeigt werden, dass mit miR-20a beladene RISC-Komplexe aus Zell-Lysaten eingefangen und isoliert werden können. In folgenden Zellkulturexperimenten wurde der Einfluss auf die Expression des Proto-Onkogens PIM1 und des Zellzyklusregulators P21

untersucht. Innerhalb der Zellkulturanalysen konnten Effekte auf die Expression der PIM1 Kinase festgestellt werden, was sich jedoch nicht eindeutig reproduzieren ließ. Auch nach einer Adressierungserweiterung der miR-20a zur kompletten miR-17 Familie sowie zur stärker exprimierten let-7 miRNA Familie, konnten keine stabilen Effekte in Zellkulturanalysen bei PIM1 sowie P21 festgestellt werden. Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe von Michael Göbel jedoch in *in vitro* Experimenten bestätigen, dass beladene RISC-Komplexe mit Hilfe eines bifunktionalen Adapters zu einer spezifischen RNA umgeleitet werden können. Dies deutet darauf hin, dass es mit Hilfe eines stabileren mRNA Systems in Zukunft möglich ist, konstantere Ergebnisse in Zellkultur Experimenten zu erlangen.

Ein Konjugat aus einem DNA/LNA Mixmer-Oligonukleotid und der synthetischen Nuklease Tris(2-aminobenzimidazol) wurde im zweiten Projekt dieser Arbeit untersucht. Aufbauend auf vielversprechende Ergebnisse mit entsprechenden DNA- sowie PNA-Konjugaten, welche in der Arbeitsgruppe von Michael Göbel erlangt werden konnten, wurden in dieser Arbeit zunächst *in vitro* Spaltkinetiken mit DNA/LNA Mixmer-Konjugaten durchgeführt. Diese bestätigten, dass der Wechsel zu DNA/LNA-Oligonukleotiden eine deutlich schnellere Spaltkinetik hervorbringt, wobei die Halbwertszeit der RNA-Substrate von 10 bis 20 Stunden auf 4 Stunden verkürzt werden konnte. Zudem spaltete das Nuklease-Konjugat RNA-Substrate von einer Länge von 412 Nukleotiden erfolgreich und spezifisch, was zuvor nur mit einer Substratlänge von 29 Nukleotiden gezeigt werden konnte. Die Spaltungsposition wurde ebenfalls charakterisiert und zeigt sich in unmittelbarer Nähe um die Bindung des Mixmer-Oligonukleotids mit dem adressierten RNA Substrat.

Bei den durchgeführten Zellkulturanalysen wurde wie im ersten Projekt die mRNA der PIM1-Kinase adressiert, wobei vereinzelt Effekte beobachtet werden konnten, welche allerdings nicht reproduzierbar waren. Die vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse indizieren jedoch, dass bei einer weiteren Verbesserung der Spaltkinetik, deutliche Effekte in Zellkulturanalysen erlangt werden können.

Abstract

Since the discovery of RNA Interference (RNAi) in the late 90s, ongoing work and development of this genetic engineering tool has been executed in different biological and medical fields. This enabled the discovery of unknown protein functions and the development of RNA-Interference-based therapeutic agents. Usage of small non-coding RNAs, which can regulate the gene expression via RNAi, is one very promising therapeutic option, because microRNAs (miRNAs) possess a substantial influence on the regulation of countless biological processes such as differentiation, or cell proliferation. Therefore they can have tumour-suppressive as well as oncogenic properties. Besides innate miRNAs, small synthetic RNAs have been developed for therapeutical approaches and genetic analysis such as small interfering RNAs (siRNAs), enabling the usage of more stabilized and modified RNAs. The possibility of modification increased the areas of application for miRNAs and siRNAs as well as facilitating new therapeutic options.

The first project of this thesis analysed the possibility of redirecting RISC to a specific mRNA via a bifunctional adapter oligonucleotide. This approach allows an inhibition of oncogenic miRNA function and a simultaneous suppression of a proto-oncogenic mRNA translation, which can lead to a synergistic antitumor effect. One adapter part is thereby directed against an oncogenic miRNA, which was loaded before into a RISC. The 3'-UTR of a specific mRNA is addressed by the second part of the adapter, which enables then the redirection of the indirectly bound RISC to the addressed mRNA and thereafter inducing its degradation.

At the beginning of this analysis the proto-oncogene PIM1 and the oncogenic miR-20a were addressed via the bifunctional adapter. Within *in vitro* studies it was shown that it is possible to bind and isolate miR-20a loaded RISCs from cell lysates. The bifunctional adapter effect was then examined in cell culture experiments, in which the protein expression of the proto-oncogene PIM1 and the tumour-suppressor P21, which is a target of miR-20a, was analysed. In observed cases the cell culture experiments showed a clear effect on the PIM1 expression, however this could not be reproduced stably. A change of the addressing miRNA part from miR-20a to the complete miR-17a family and then to the higher expressed let-7 miRNA family was also not able to stabilize the influence on the PIM1 and P21 expression. Nevertheless, the group of Michael Göbel was recently

able to show a functional redirection of RISCs in *in vitro* assays. This indicates that in cell culture experiments more constant results are possible with a more stable mRNA system.

The second topic of this thesis addressed the function of a metal-free synthetic nuclease-conjugate with a DNA/LNA mixmer-oligonucleotide and tris(2-aminobenzimidazole). Building up on very promising results from the Göbel group with DNA and PNA conjugates, in this thesis *in vitro* cleavage kinetics were done with a DNA/LNA mixmer conjugate. Those confirmed a clear reduction of the RNA substrate half-life compared to former analysed conjugates and furthermore a specific and efficient cleavage of longer RNA substrates with a length up to 412 nt. The cleavage position could be characterised and localized around the binding of the mixmer oligonucleotide with the addressed RNA substrate. The PIM1 mRNA was then addressed in subsequent cell culture experiments, in which occasional effects were observed, yet not reproducible. The promising *in vitro* results nevertheless indicate, that with further improvement of the cleavage kinetics, clear cell culture effects can be obtained.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Hartmann bedanken, der mir es nicht nur ermöglicht hat, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, sondern ebenfalls für die Unterstützung und für alle hilfreichen und konstruktiven Anregungen. Ein weiterer Dank geht an meinen Zweitbetreuer Prof. Dr. Arnold Grünweller, welcher mir vor allem bei allen Zellkulturfragen stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Des Weiteren möchte ich mich natürlich auch bei Prof. Dr. Michael Göbel für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken, aber ebenfalls für alle konstruktiven Besprechungen und Anregungen im Laufe unserer Kooperationsprojekte. Für die Teilnahme als Mitglieder meiner Prüfungskommission bedanke ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Jens Kockskämper sowie bei Frau Prof. Dr. Maike Petersen. Bei meinen Kooperationspartnern Ute, Felix und Mathias bedanke ich mich sehr für ihre hilfreichen und konstruktiven Ratschläge sowie anregenden Diskussionen.

Natürlich geht auch ein großer Dank an alle meine wunderbaren Kollegen. Vor allem an meine Bürokollegen Falk, Jana, Marietta und Markus – ich vermisse unsere Gespräche und die grüne „Höhle“ jetzt schon. Auch Kerstin und Katrin möchte ich danken, die mir vor allem in der Anfangszeit sehr geholfen haben. Ohne Katja wäre ich bei einigen organisatorischen Hürden aufgeschmissen gewesen und ein großes Dankeschön geht auch an meine Zellkulturmitstreiterin Wiebke, vor allem für das Gegenlesen und Korrigieren dieser Arbeit. Natürlich geht ein Dank auch an die restliche „Kochgruppe“: Aileen, Amri, Clemens, Dominik, Jana W., Nadine, Nina, Marcus, Paul, Rebecca, Simone und Sweetha - Ohne euch wären die letzten Jahre nur halb so schön gewesen und vor allem weniger kulinarisch. So eine harmonische Arbeitsatmosphäre erlebt man wirklich nur selten. Hierbei möchte ich mich auch nochmal besonders bei Jana und Isabell bedanken. Ihr Beide habt mir vor allem in den letzten Monaten sehr beigestanden.

Darüber hinaus möchte ich meinem weiteren Freundeskreis und besonders meiner Familie sowie meinen Eltern von Herzen danken! Ohne eure seelische, moralische und natürlich auch finanzielle Unterstützung hätte ich weder mein Studium noch meine Promotion durchführen können. Dafür bin ich euch auf ewig dankbar. Zu guter Letzt geht ein besonderer Dank an Damian. Für seinen stetigen Rückhalt, seinen Motivationzuspruch und für ein immer offenes Ohr zu dieser Zeit.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABSTRACT.....	III
DANKSAGUNG.....	V
VERZEICHNISSE.....	VI
<i>Inhaltsverzeichnis.....</i>	<i>VI</i>
<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>VIII</i>
<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>IX</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis.....</i>	<i>X</i>
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. RNA INTERFERENZ UND ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE.....	1
1.1.1. miRNAs.....	1
1.1.2. siRNA.....	4
1.1.3. miRNA und siRNA Biogenese.....	5
1.1.4. AGO und RISC.....	9
1.1.5. Antisense-Oligonukleotide.....	11
1.2. SYNTHETISCHE RIBONUKLEASEN.....	16
1.2.1. Metallfreie synthetische Ribonukleasen	17
1.3. UNTERSUCHTE ONKOGENE UND PROTEINE	19
1.3.1. P21.....	19
1.3.2. PIM1	21
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1. MATERIAL	26
2.1.1. Verbrauchsmaterialien	26
2.1.2. Enzyme	28
2.1.3. Puffer und Lösungen.....	28
2.1.4. Spezifische Chemikalien	30
2.1.5. Geräte.....	30
2.1.6. Größenstandards	32
2.1.7. Kits.....	32
2.1.8. Kulturmedien	33
2.1.9. Antikörper.....	33
2.1.10. Oligonukleotide und Plasmide.....	34
2.2. METHODEN.....	39
2.2.1. Zellkultur.....	39

2.2.2. Nukleinsäure Methoden	44
2.2.3. RNA Methoden.....	56
2.2.4. Protein-Methoden	61
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	67
3.1. RISC-UMLEITUNG DURCH EIN BIFUNKTIONELLES ADAPTER- OLIGONUKLEOTID	67
3.1.1. Pulldown von humanen AGO2 Proteinen aus K562 ZellLysaten.....	69
3.1.2. Relative Expression von PIM1, P21 und miR-20a.....	70
3.1.3. Analyse der Transfektions-effizienz in K562-Zellen.....	71
3.1.4. Analyse der Adaptoren 8, 9 und 9-s in K562-Zellen	73
3.1.5. Analyse des bifunktionellen Adapter 21	76
3.1.6. Untersuchung des Adapter 21 Effekts in HeLa-Zellen.....	83
3.1.7. Dual-Luciferase Assay in HeLa-Zellen.....	92
3.1.8. Zusammenfassung und Diskussion.....	93
3.1.9. Ausblick	99
3.2. ANALYSE VON DNA/LNA KONJUGATEN MIT DER ARTIFIZIELLEN NUKLEASE TRIS(2-AMINO- BENZIMIDAZOL)	102
3.2.1. Herstellung des 155-mer Substrats	107
3.2.2. Herstellung des 412-mer Substrats	108
3.2.3. Spaltkinetiken	109
3.2.4. Identifikation der Spaltposition.....	113
3.2.5. Zellkultur Analysen.....	116
3.2.6. Zusammenfassung und Diskussion.....	123
3.2.7. Ausblick	125
4. LITERATURVERZEICHNIS	127
5. ANHANG	149
5.1. PLASMIDKARTEN	149
5.2. BINDEMÖGLICHKEITEN DER VERWENDETEN KONTROLLEN AN DIE <i>PIM1</i> MRNA	155
5.3. WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	156
5.4. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biogenese von miRNA und siRNA	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Antisense-Mechanismen	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Antisense-Oligonukleotid Modifikationen	15
Abbildung 4: Aufbau des PIM1 Gens.....	21
Abbildung 5: Regulations-Netzwerk um PIM1	23
Abbildung 6: Site-directed Mutagenesis	53
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Western Blots während der Proteinübertragung in der Blotting-Apparatur.....	63
Abbildung 8: Schematische Darstellung der RISC-Umleitung durch einen bifunktionellen Adapter.....	68
Abbildung 9: WB eines hAGO2 Pulldown aus K562 Lysaten mit einem biotinylierten LNA-Oligonukleotid.....	69
Abbildung 10: RT-qPCR Analyse der miR-20a, PIM1 und P21 mRNA-Spiegel in SKOV3, HeLa und K562-Zellen.....	71
Abbildung 11: Transfektionstest eines GFP Plasmids in K562-Zellen mit Lipofectamine™2000.....	72
Abbildung 12: Schematische Darstellung der verwendeten Adapter 8, 9 und 9-s sowie LNAs	73
Abbildung 13: PIM1, P21 und β -Aktin WB nach K562 Transfektion mit Adapter 8, 9 und 9-s.....	75
Abbildung 14: PIM1, P21 und β -Aktin WB nach K562 Transfektion mit Adapter 9-s.....	76
Abbildung 15: Schematische Darstellung weiterer Adapter-Kontrollen sowie des Adapter 21	77
Abbildung 16: PIM1, P21 und β -Aktin WB Analyse nach K562 Transfektion mit Adapter 21	78
Abbildung 17: PIM1, P21 und β -Aktin WB Wiederholung nach K562 Transfektion mit Adapter 21	79
Abbildung 18: WB-Analyse nach K562 Transfektion mit Adapter 21.....	82
Abbildung 19: WB-Analyse nach HeLa Transfektion mit Adapter 21 und den Kontrollen K2 und K3	84
Abbildung 20: WB-Analyse mit weiteren Kontrollen nach HeLa Transfektion mit Adapter 21.....	86
Abbildung 21: WB-Analyse der K Bi und K let Kontrolle sowie Co-Transfektion von M let7 nach HeLa Transfektion mit Adapter 21	87
Abbildung 22: WB-Analyse nach Lipofectamin™3000 Transfektion in HeLa-Zellen.....	89
Abbildung 23: WB-Analyse nach Lipofectamine™3000 Transfektion mit allen Kontrollen in HeLa-Zellen	90
Abbildung 24: WB-Analyse von Adapter 21 Titrationsexperimenten in HeLa-Zellen	91
Abbildung 25: Dual-Luciferase Assay in HeLa-Zellen mit Adapter 21	92
Abbildung 26: Tris(2-aminobenzimidazol) Konjugat.....	103
Abbildung 27: RNA Sekundärstruktur Vorhersage der PIM1 3'-UTR.....	104
Abbildung 28: RNA Sekundärstruktur Vorhersage des 155-mer Substrats	105
Abbildung 29: RNA Sekundärstruktur Vorhersage des 412-mer Substrats	106
Abbildung 30: PAA Gel-Analyse des 155-mer T7 Transkription Produkts	107
Abbildung 31: PAA Gel-Analyse des 412-mer T7 Transkription Produkts	108
Abbildung 32: PAA Gel-Analyse der 155-mer und 412-mer Spaltassays mit Konjugat 12.....	110

Abbildung 33: Spaltkinetik des 155-mer Substrats	111
Abbildung 34: Spaltkinetik des 412-mer Substrats	112
Abbildung 35: Primer-Extension Experiment mit 155-mer und 412-mer Substrat.....	114
Abbildung 36: WB-Analyse nach Transfektion mit Konjugat 12 in K562-Zellen.....	116
Abbildung 37: Wiederholung der WB-Analyse nach Transfektion mit Konjugat 12 in K562-Zellen.....	118
Abbildung 38: Zweite Wiederholung der WB-Analyse nach Transfektion mit Konjugat 12 in K562-Zellen	119
Abbildung 39: WB-Analyse nach Transfektion mit Konjugat 12 und neuen Kontrollen in HeLa-Zellen ...	121
Abbildung 40: WB-Analyse nach Lipofectamine™3000 Transfektion mit Konjugat 12 in HeLa-Zellen ...	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Enzyme	28
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen	28
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten spezifischen Chemikalien	30
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte	30
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Größenstandards	32
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Kits	32
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Kulturmedien.....	33
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper	33
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primer.....	34
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten siRNA und Gapmer	35
Tabelle 12: Auflistung der modifizierten Oligonukleotide.....	35
Tabelle 13: Zusammensetzung PAA-Lösung	46
Tabelle 14: Zusammensetzung eines PCR Ansatzes.....	50
Tabelle 15: Thermocycler-Einstellung für das PCR Programm.....	51
Tabelle 16: Reaktionsansatz Restriktionsverdau	52
Tabelle 17: Kolonie PCR Schema	55
Tabelle 18: Reaktionsansatz T7-Transkription	57
Tabelle 19: Reaktionsansatz Radioaktive 5'-Endmarkierung.....	58
Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription	59
Tabelle 21: Reaktionsbedingungen der qPCR Analyse	60
Tabelle 22: Zusammensetzung 12 % SDS-Gel	62

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
[γ - ^{32}P]-ATP	Gamma ^{32}P -Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
ϵ	Molarer Absorptionskoeffizient
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromol
2'-F	2'-Fluoro
2'-O-Me	2'-O-Methyl
2'-O-MOE	2'-O-Methoxyethyl
^{32}P	Phosphor-32 Isotop
A_{260}	Absorption bei 260 nm
A_{280}	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
AGO	Argonautenprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>Adenylate-uridylate-rich element</i>
ARP	<i>Arginin rich protein</i>
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ASO	Antisense-Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BRCA1	Brustkrebsgen 1
Bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ca^{2+}	Calcium Ion
CDC25A	<i>Cell division cycle 25A</i>

CDC25C	<i>Cell division cycle 25C</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cpm	<i>Counts per minute</i>
dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytidin
DCP2	<i>mRNA-Decapping enzyme 2</i>
ddH ₂ O	Doppel-destiliertes Wasser
dG	Desoxyguanosin
DGCR8	<i>5 DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>acid</i>)
DNase I	Deoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIF4E	Eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4E
FastAP	Thermosensitive Alkaline Phosphatase
FCS /FBS	Fetales Kälberserum
FD	<i>Fast digest</i>
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
fwr	<i>Forward</i>
g	Gramm
h	Stunde (<i>hour</i>)

hATTR	Hereditäre Transthyretin-vermittelte Amyloidose
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
HuR	Hu Antigen R
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
let-7	Lethal-7
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M7G	7-Methylguanosin
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg ²⁺	Magnesium Ion
min	Minute
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA	microRNA
mL	Mililiter
mM	Milimolar
MRE	<i>microRNA response element</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
nmol	Nanomolar

NP-40	Nonylphenolethoxylat
nt	Nukleotid
NUMA1	<i>Nuclear mitotic apparatus protein 1</i>
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxylgruppe
p.a.	per analysis
P21	Inhibitor Clyclin-abhängiger Kinasen 1A (CDKN1A)
P27	Inhibitor Clyclin-abhängiger Kinasen 1B (CDKN1B)
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEI	Polyethylenimin
PIM	<i>Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus-1</i>
PMO	<i>phosphorodiamidate morpholino oligo</i>
pmol	Picomol
PNA	Peptidnucleinsäure
PO	Phosphodiester
PP2A	Proteinphosphatase 2A
Pre-miRNA	Precursor miRNA
Pri-miRNA	Primäre miRNA
PS	Phosphorothioat
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative <i>real time</i> PCR
RAS	<i>Rat sarcoma</i> Protein
rev	revers
RhBD	<i>rhizobactin siderophore biosynthesis</i> Proteindomäne
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>acid</i>)

RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Runden pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
ssDNA	Einzelsträngige DNA
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
SV40	<i>simian vacuolating virus 40</i>
Tab.	Tabelle
T4 PNK	T4 Polynukleotidkinase
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGFβ	<i>tissue growth factor beta</i>
TTP	RNA-Bindeprotein Tristetraprolin
U	Unit
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent
WB	Western Blot
XRN1	5'-3'-Exoribonuklease 1
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1. RNA INTERFERENZ UND ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE

Die *messenger* RNA (mRNA) fungiert als intermediäres Molekül zwischen Genen und Proteinen. Dies macht sie zu einem vielversprechenden Behandlungsziel, da eine aberrante Proteinexpression, die meist im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern steht, darüber beeinflusst werden kann. Eine mögliche Strategie, um die Proteinexpression zu verändern, stellt die RNA Interferenz (RNAi) da, bei welcher ein kurzer RNA Strang an die mRNA bindet und so deren Translation verhindert. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Genregulation und der angeborenen Immunantwort bei Virusinfektionen (Carthew & Sontheimer, 2009). RNAi wurde erstmalig von Andrew Fire und Craig Mello bei Untersuchungen im Fadenwurm *C.elegans* beschrieben (Fire et al., 1998), wofür beide 2006 den Nobelpreis erhielten. Es existieren verschiedene endogene und exogene nicht-kodierende RNA Moleküle, die diesen Effekt vermitteln können wie z.B. microRNAs (miRNAs) und *small interfering RNAs* (siRNAs). Neben dem natürlich vorkommenden RNAi Effekt existiert ein weiterer Ansatz, der die Bindung an mRNA Moleküle nutzt, um die anschließende Proteinexpression zu beeinflussen. Hierbei werden synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet und deren Antisense-Effekte genutzt. Diese unterschiedlichen RNAi Moleküle, sowie ihre Biogenese, werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

1.1.1. MIRNAS

Die erste miRNA wurde 1993 von der Ambros und Ruvkun Gruppe im Fadenwurm *C. elegans* entdeckt. Sie fanden heraus, dass es sich hierbei um eine nicht-Protein codierte kleine RNA handelt, welche eine komplementäre Sequenz innerhalb der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) einer anderen RNA besitzt. Diese RNA wiederum wurde durch diesen untranslatierten Bereich posttranskriptional herunterreguliert (R. Lee et al., 2004; R. C. Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Seit dieser Entdeckung wurden

miRNAs in vielen tierischen Modellorganismen gefunden und es werden weiterhin immer wieder neue miRNAs identifiziert und ihre Rolle innerhalb der Genregulation untersucht (De Rie et al., 2017).

MiRNAs zeichnen sich durch eine durchschnittliche Länge von 22 Nukleotiden aus und werden von der DNA aus zuerst zu primären miRNAs (pri-miRNAs) transkribiert. Diese werden weiter zu Vorläufer miRNAs (pre-miRNAs) und schließlich zu maturen miRNAs prozessiert. In den meisten Fällen führt die Interaktion von miRNAs mit der 3'-UTR einer mRNA zu deren supprimierten Expression (Ha & Kim, 2014) und seltener zu deren Aktivierung (Vasudevan, 2012). Neben der Bindung von miRNAs an 3'-UTRs konnte mittlerweile gezeigt werden, dass auch andere genomische Bereiche adressiert werden, wie 5'-UTRs (Lytle et al., 2007), kodierende Bereiche (Tay et al., 2008) und ebenfalls Promotorelemente (Place et al., 2008). Einige neuere Studien lassen vermuten, dass miRNAs zwischen verschiedenen subzellulären Bereichen hin und her transportiert werden, um die Rate der Transkription sowie Translation regulieren zu können (Makarova et al., 2016).

Die aberrante Expression von miRNAs steht in Korrelation zu verschiedenen humanen Krankheiten (Paul et al., 2018; Tüfekci et al., 2014). Des Weiteren werden sie als potentielle Diagnostikmarker bei Krebserkrankungen angesehen (Hayes et al., 2014) sowie als Prognosemarker für die Unterscheidung von bösartigen und gutartigen Tumoren (Murakami et al., 2006; Yanaihara et al., 2006). Zurzeit existiert noch keine zugelassene miRNA-basierte Therapie, es befinden sich jedoch einige synthetisch hergestellte Oligonukleotide in den klinischen Phasen I und II. Diese agieren entweder als miRNA *mimic* oder als AntimiR, welches komplementär zu einer endogenen miRNA ist und so dessen Wirkung inhibieren kann (Bajan 2020).

1.1.1.1. MIR-20A

Die miRNA miR-20a gehört zusammen mit der miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b und miR-92a zum miR-17-92 Cluster und zählt zur miR-17 Familie (Mogilyansky & Rigoutsos, 2013), welcher onkogene Eigenschaften zugeschrieben werden. Eine Induzierung der miR-17 Familie, welche unter anderen durch das Onkogen MYC hervorgerufen werden kann, führt zu einer Dysregulation des Zellzyklus und der

Apoptose. Des Weiteren kann die Tumordinvasion durch eine erhöhte Interaktion mit *PTEN* und *E2F* Genen begünstigt werden (S. Q. Liu et al., 2014; O'Donnell et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass miR-20a in festen und auch hämatopoetischen Krebsarten hochreguliert ist (Mogilyansky & Rigoutsos, 2013) und eine wichtige regulatorische Rolle bei der Entwicklung von Darmkrebs einnimmt, da es hierbei den TGF- β Signalweg beeinflusst (Dews et al., 2010). Im Fall des Zellzyklus Regulators P21 wurde ein direkter Einfluss von miR-20a durch Binden an die 3'-UTR nachgewiesen (Maren Thomas et al., 2012), was ebenfalls bei der Entstehung von Darmkrebs eine Rolle spielt (Sokolova et al., 2015).

1.1.1.2. LET-7

Let-7 (lethal) gehört zu den ersten identifizierten miRNAs und wurde im Fadenwurm *C. elegans* entdeckt. Dort konnte die Regulation der miRNA mit der Stammzellteilung und Differenzierung in Zusammenhang gebracht werden (Reinhart et al., 2000). Die let-7 miRNA wird in vielen verschiedenen Tierarten und im Menschen exprimiert, kommt jedoch nicht in Pflanzen vor (Hertel et al., 2012; Pasquinelli et al., 2000). Während in Nematoden und bei der Fruchtfliege nur eine einzelne Isoform vorliegt, besitzt der Mensch 10 verschiedene reife let-7 Isoformen, welche auf 12 unterschiedlichen genomischen Loci kodiert sind (Roush & Slack, 2008; Ruby et al., 2006). Bei der Bezeichnung der let-7 Familienmitglieder werden die Isoformen durch unterschiedliche Buchstaben differenziert und eine nachfolgende Nummer gibt an, von welcher Stelle aus sie im Genom transkribiert werden (z.B. let-7a-1).

Zusammengefasst werden den miRNAs der let-7 Familie zwei biologische Hauptfunktionen zugewiesen. Zum einen scheinen sie als essentielle Regulatoren bei der späten Entwicklung zu agieren, was vor allem bei *C. elegans* und *D. melanogaster* untersucht wurde (Bashirullah et al., 2003; Großhans et al., 2005). Bei Hühnern und Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass let-7 bei der Gliedmaßen-Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (Lancman et al., 2005; Mansfield et al., 2004), allerdings ist die exakte Rolle der let-7 Familie innerhalb der Säugetierentwicklung noch relativ unbekannt. Neben dem Einfluss innerhalb der Differenzierung haben die let-7 miRNAs ebenfalls eine wichtige Rolle als Tumorsuppressoren. Es konnte gezeigt werden, dass let-

7 und *rat sarcoma* (RAS) bei humanen Krebsarten interagieren (S. M. Johnson et al., 2005) und let-7g die Tumorgenese bei einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom blockieren kann, was durch die Suppression von RAS vermittelt wird (Kumar et al., 2008). Einige let-7 Familienmitglieder unterdrücken Zellzyklus-Regulatoren, wie Cyklin A, Cyklin D1, Cyklin D3 sowie CDK4 und blockieren aberrantes Zellwachstum in Krebszellen (C. D. Johnson et al., 2007; Schultz et al., 2008). Im Fall von let-7a konnte ein Einfluss auf die MYC Expression gezeigt werden, was zu einem inhibierten Zellwachstum in Burkitt-Lymphoma Zellen führte (Sampson et al., 2007).

1.1.2. siRNA

Seit der Entdeckung der siRNA (Simons & Kleckner, 1983) wurde diese als Forschungswerkzeug genutzt, um die Genfunktion in verschiedenen Zelltypen untersuchen zu können und die Proteinexpression zu beeinflussen. Der siRNA vermittelte RNAi Signalweg dient ursprünglich als natürlicher Abwehrmechanismus gegen eindringende RNA-Viren, bei welchem pathogene doppelsträngige RNA Moleküle erkannt und diese daraufhin abgebaut werden (Carthew & Sontheimer, 2009).

Diese exogenen siRNAs (exo-siRNAs) können nicht nur natürlichen Ursprungs sein, sondern auch als synthetische siRNA in das Zytoplasma eingebracht werden.

Beim Einbringen langer dsRNAs (>30 Nukleotide) führt dies zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems, genauer gesagt des Interferon (IFN) Signalweges, der zum Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen gehört (Gantier & Williams, 2007). Wenn die Prozessierung durch die Ribonuklease Dicer (s. nächsten Abschnitt) allerdings umgangen wird, was durch synthetisch hergestellte siRNAs möglich ist, kann eine IFN Antwort verhindert werden (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001). Auch wenn spätere Studien vermuten lassen, dass synthetische siRNAs eine partielle IFN Antwort induzieren können, was unter anderem Sequenz abhängig sein kann (Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003), dient die siRNA als ein wirkungsvolles Werkzeug zur Gen-Inaktivierung und besitzt ein großes therapeutisches Potential.

Dieses wurde in den letzten Jahren erkannt, woraufhin siRNAs als „*small molecules*“ Arzneimittel von mehreren Pharmafirmen in die Entwicklung aufgenommen wurden. Bei den ersten klinischen Tests führte die Verwendung unmodifizierter siRNAs zu toxischen

Nebeneffekten und nicht zum erwünschten RNAi Effekt (DeVincenzo et al., 2010; Kleinman et al., 2008). Jedoch konnten durch eine ständige Weiterentwicklung des siRNA Designs, der chemischen Formulation und sorgfältigerer Sequenzauswahl, mehrere siRNA Arzneimittel-Kandidaten in die klinischen Testphasen II und III aufgenommen werden (Setten et al., 2019). Mittlerweile gibt es auch siRNA Arzneimittel auf dem Markt, wie das Medikament Patisiran, welches 2018 von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen wurde und zur Behandlung der Leberkrankheit Hereditären transthyretin assoziierter Amyloidose (hATTR) eingesetzt wird (Adams et al., 2018).

Neben den natürlich vorkommenden und synthetischen *exo-siRNAs* wurden in den letzten Jahren auch endogene siRNAs (*endo-siRNAs*) identifiziert, welche vor allem in Pflanzen vorkommen sowie in einigen Tierarten. Diese haben ihren Ursprung aus Transposons, natürlich vorkommenden Antisense Transkripten oder Pseudogenen. (Czech et al., 2008; Ghildiyal et al., 2008; Okamura & Lai, 2008) Die Rolle von *endo-siRNAs* innerhalb der Genregulation ist noch relativ unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass sie einen Einfluss auf alternative Spleißungsvorgänge haben, was z.B. beim Rezeptor CD44 in HeLa-Zellen gezeigt werden konnte (Ameyar-Zazoua et al., 2012).

1.1.3. MIRNA UND siRNA BIOGENESE

Etwa 50 % aller bisher identifizierten miRNAs werden aus Introns prozessiert und nur wenige aus Exons proteinkodierter Gene. Alle anderen, welche intergenisch kodiert sind, werden unabhängig von ihren Wirtsgenen transkribiert und besitzen einen eigenen Promotor (De Rie et al., 2017; Y. K. Kim & Kim, 2007). Teilweise werden mehrere miRNAs als ein einzelnes langes Transkript, auch *Cluster* genannt, synthetisiert und besitzen meist eine ähnliche oder gleiche *Seed-Sequenz*. In diesem Fall werden diese miRNAs zur gleichen Familie gezählt (Tanzer & Stadler, 2004).

Beim klassischen miRNA Biogeneseweg werden transkribierte *pri-miRNAs* mit Hilfe eines Mikroprozessor Komplex, welcher aus dem RNA-Bindeprotein *DiGeorge Syndrome Critical Region 8* (DGCR8) und der Ribonuklease Drosha besteht, zu *pre-miRNAs* prozessiert (Denli et al., 2004). Dabei wird die *pri-miRNA* von Drosha an den Übergängen zur charakteristischen *Hairpin*-Struktur geschnitten, was zu einem zwei

Nukleotid langen 3'-Überhang der pre-miRNA führt (Han et al., 2004). Anschließend werden diese durch den Exportin 5 (XPO5)/RanGTP Komplex ins Zytoplasma transportiert und dort weiter durch die RNase III Endonuklease Dicer prozessiert (Denli et al., 2004; Okada et al., 2009). Hierbei wird der terminale Loop entfernt, sodass anschließend die mature imperfekte miRNA Duplexform vorliegt, welche eine Länge von 22 Nukleotiden besitzt (Park et al., 2011). Einer der beiden Stränge des Duplex wird daraufhin in ATP-Abhängigkeit von einem der vier Argonaute (AGO) Proteine gebunden. Welcher Strang gebunden wird, entscheidet die thermodynamische Stabilität (Khvorova et al., 2003). Grundsätzlich bevorzugt AGO den Strang mit der schwächeren Stabilität, welcher daraufhin als *guide* Strang bezeichnet wird. Der nicht gebundene Strang, welcher *passenger* Strang genannt wird, wird vom *guide* Strang getrennt und im Anschluss abgebaut (Noland & Doudna, 2013).

Neben dem klassischen Biogenese Weg gibt es auch Drosha/DGCR8 unabhängige Prozessierungen, wie z.B. bei Mirtrons oder 7-methylguanosin (m7G) pre-miRNAs, welche direkt mittels Exportin ins Zytoplasma transportiert werden (M. Xie et al., 2013). Eine Dicer unabhängige Biogenese kann ebenfalls vorkommen, wenn die pre-miRNA Länge zu kurz ist. In diesem Fall kann Dicer diese nicht mehr als Substrat erkennen (Yang et al., 2010) und AGO2 übernimmt daraufhin das Spalten der miRNA (Cheloufi et al., 2010).

Der minimale *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) besteht aus dem *guide* RNA Strang sowie dem AGO Protein (Kawamata & Tomari, 2010). Dessen Spezifität gegenüber seinem mRNA Target wird mittels komplementären *miRNA response elements* (MREs) vermittelt, an welchem der *guide* Strang binden kann. Ob es nach der Interaktion zu einer Spaltung der Ziel-mRNA durch AGO kommt oder eine miRISC vermittelte translationale Inhibition stattfindet, hängt von der vollständigen Komplementarität der Bindung ab. Nur bei einer vollständigen miRNA:MRE-Interaktion wird die Endonuklease Aktivität des AGO-Proteins induziert und es kommt zur Spaltung der mRNA (Jo et al., 2015). Die miRNA:MRE Bindung wird hauptsächlich durch die ersten 8 Nukleotide am 5'-Ende vermittelt, was der *Seed*-Region der miRNA entspricht (Ellwanger et al., 2011). Allerdings wird durch eine weitere Interaktion am 3'-Ende die Stabilität sowie die Spezifität der Interaktion beeinflusst (Broughton et al., 2016).

Wie auch bei der miRNA Biogenese werden siRNAs, wenn sie endogen exprimiert werden, zuerst durch die Ribonuklease Dicer im Zytoplasma in kleinere doppelsträngige RNA (dsRNA) Moleküle prozessiert (Piatek & Werner, 2014). Diese gekürzten dsRNAs sind zwischen 21 und 23 Nukleotide lang und interagieren ebenfalls mit dem RISC-Komplex, woraufhin der *passenger* Strang durch AGO2 abgebaut wird. Der *guide* Strang dirigiert daraufhin den mit siRNA beladenen RISC-Komplex zur Ziel-mRNA. Durch vollständige Bindung an diese, was durch die lückenlose Komplementarität von siRNA und Ziel-mRNA zustande kommt, wird das Schneiden der mRNA durch AGO2 induziert (Meister & Tuschl, 2004). Hierin besteht der größte Unterschied zum miRNA vermittelten RNAi Effekt, bei welchem es in der Regel nicht zum direkten Spalten der mRNA kommt, sondern eine Hemmung der Translation zur Folge hat (s. Abb. 1).

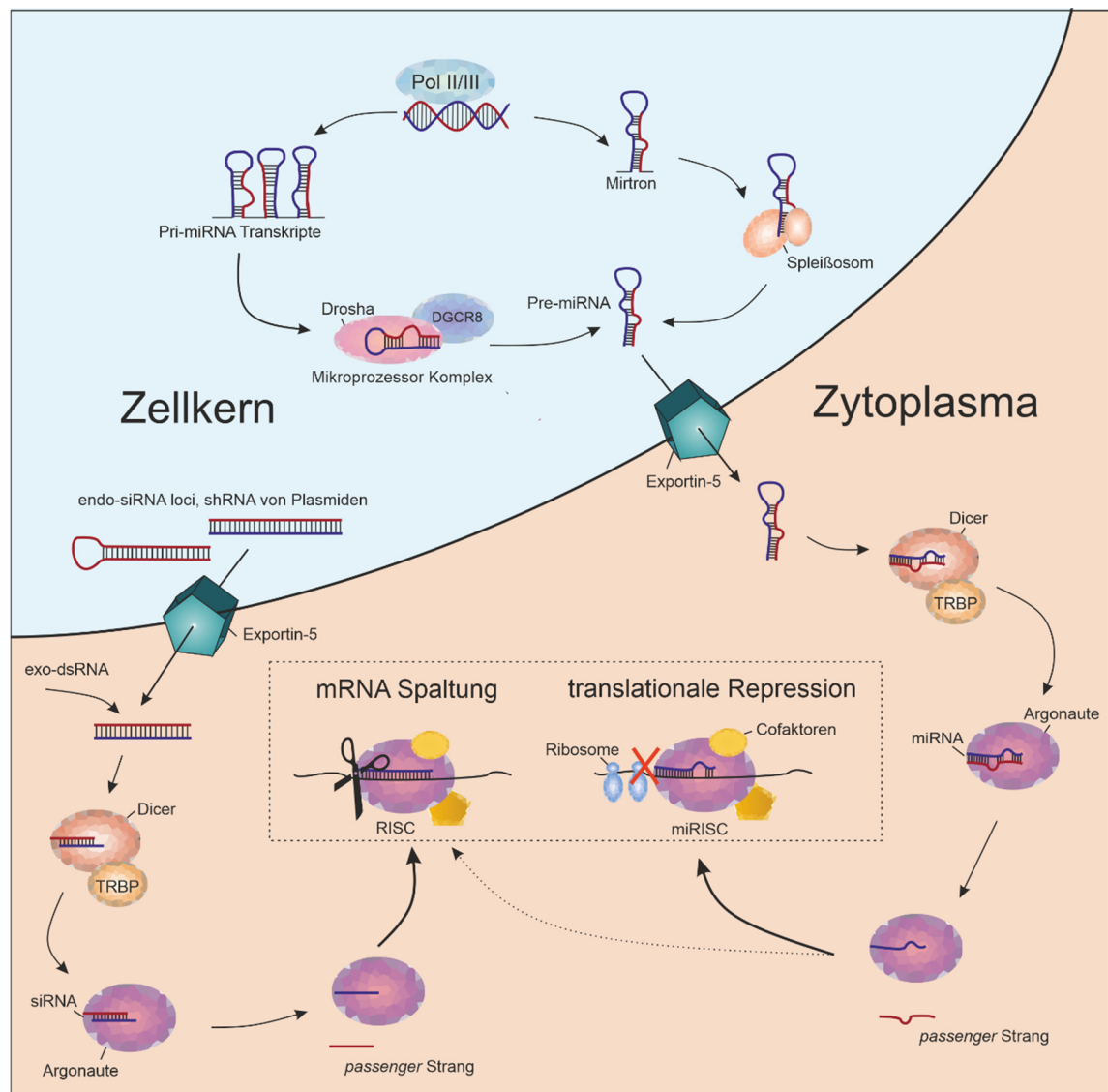


Abbildung 1: Biogenese von miRNA und siRNA

a) Transkription von miRNAs und weitere Prozessierung im Zellkern durch das Spleißosom oder den Mikroprozessor Komplex, bestehend aus Drosha und DGCR8. Das Pre-miRNA Transkript wird mit Hilfe von Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert und dort von Dicer weiter zur doppelsträngigen miRNA/miRNA* prozessiert, welche von Argonaute-Proteinen identifiziert und gebunden wird. Anschließend folgt die Formation des RISC-Komplexes, Binden der Ziel-mRNA und darauffolgend eine Translationsinhibition oder eine Spaltung der mRNA (seltener).

b) Transport von endo-siRNA oder shRNA durch Exportin-5 aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Weitere Prozessierung, auch von exo-siRNAs, erfolgt durch Dicer, woraufhin der Doppelstrang von einem Argonaute-Protein gebunden werden kann. Im Anschluss formiert sich der RISC-Komplex und die Ziel-mRNA wird gebunden, was eine Spaltung dieser durch AGO2 zur Folge hat.

1.1.4. AGO UND RISC

Alle Klassen der kleinen RNAs interagieren innerhalb des RNAi Mechanismus mit einem AGO-Protein und demzufolge auch mit dem RISC-Komplex. Die vier humanen Proteine der AGO Familie (AGO1-4) besitzen alle eine molekulare Masse von ca. 100 kDa und haben eine ähnliche Struktur zueinander (Jinek & Doudna, 2009). Diese unterscheidet sich nur bei einigen wenigen nicht-konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum (Faehnle et al., 2013). Die restlichen vier konservierten Domänen setzen sich aus der N-terminalen-Domäne, der PIWI/Argonaute/Zwille (PAZ)-Domäne, der MID-Domäne und der PIWI-Domäne zusammen (Müller et al., 2020). Die PAZ-Domäne übernimmt dabei die Aufgabe der Verankerung des 3'-Endes und die MID-Domäne bindet an das 5'-Phosphat der *guide* RNA (Boland et al., 2010; Yan et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass neben den anderen AGO-Proteinen vor allem AGO2 mRNA-Spaltungsaktivität besitzt (Meister et al., 2004), welche unter anderem über die N-terminale-Domäne vermittelt wird, die für das richtige Positionieren der kleinen RNA verantwortlich ist (Hauptmann et al., 2013). Die PIWI-Domäne ist ein weiterer Bereich, der für die katalytische Aktivität wichtig ist. Diese ist vergleichbar mit der RNase H Domäne und beinhaltet die katalytische Tetrade DEDH (Nakanishi et al., 2012), welche für die Spaltung von RNA benötigt wird. Neben AGO2 konnte auch AGO1 als weiterer Kandidat zur Vermittlung des RNAi Effektes identifiziert werden. Es wurde kürzlich eine Isoform von AGO1 nachgewiesen, welche 33 Aminosäuren länger ist und daraufhin als AGO_{1x} benannt wurde (Ghosh et al., 2019). Diese Isoform ist in der Lage miRNAs zu binden, wobei sie jedoch nicht mit GW182 interagieren kann. Dies führt dazu, dass eine posttranslationalen Repression der Ziel-mRNA induziert wird, wobei jedoch keine Spaltung stattfindet (Singh et al., 2019).

Durch die essentielle Funktion der AGO-Proteine innerhalb des RNAi-Mechanismus, können diese dessen Aktivität stark beeinflussen. Bei AGO2 konnte gezeigt werden, dass es stark posttranslational modifiziert werden kann, was einen Einfluss auf seine Stabilität und somit auch auf die Aktivität von miRNAs und siRNAs hat (Meister et al., 2004). Nicht nur der Phosphorylierungsstatus spielt dabei eine große Rolle (Quévillon Huberdeau et al., 2017), sondern auch die Acetylierung von AGO. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Acetylierung von AGO2 zu einer erhöhten miR-19b Prozessierung führen kann (H. Zhang et al., 2019).

Die RISC Bildung unterscheidet sich bei miRNAs und siRNAs kaum und beginnt mit dem Beladen des miRNA/miRNA* oder siRNA Duplexes in ein AGO-Protein (Kawamata & Tomari, 2010). Dieser Prozess ist dynamisch und benötigt eine ATP-Hydrolyse (Iwasaki et al., 2010; Yoda et al., 2010). Durch die Bindung der 5'-Phosphatgruppe der kleinen RNA wird der *guide* Strang identifiziert, da dieser durch seine geringere Stabilität besser an die MID-Domäne binden kann (H. I. Suzuki et al., 2015). Anschließend findet die Ablösung des *passenger* Strangs statt, wobei die richtige Positionierung der RNA, sowie der N-Domäne des AGO-Proteins, eine wichtige Rolle spielen. Nach der Bindung der RNA ändert die N-Domäne ihre Position, was zu einem Lösen der ersten Basenpaare am 3'-Ende der RNA führt. Diese Konformationsänderung ist essentiell für die anschließende Ablösung des *passenger* Strangs (Kwak & Tomari, 2012). Diese kann entweder ohne oder mit Spaltung des *passenger* Strangs ablaufen. Im Fall eines AGO-Proteins, welches keine Spaltungs-Aktivität besitzt, werden beide RNA Stränge langsam weiter voneinander getrennt (Kawamata et al., 2009), wobei die PAZ-Domäne für eine Ablösung ohne Spaltung des *passenger* Strangs benötigt wird (Gu et al., 2012). Wenn ein AGO -Protein jedoch Spaltaktivität besitzt, wird diese durch die Konformationsänderung der N-Domäne aktiviert und der *passenger* Strang wird gespalten und löst sich vom Komplex (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005), welcher nun in der Lage ist, die Ziel-RNA zu spalten oder deren Translation zu inhibieren.

Wenn der RISC-Komplex zu einer perfekt komplementären Ziel-RNA geleitet wird, kommt es zu einer Aktivierung der PIWI-Domäne des AGO2-Proteins (Yanli Wang et al., 2008). Dies führt wiederum zu einer Hydrolyse der Phosphodiesterbindung der Ziel-RNA, welche daraufhin von zellulären Exonukleasen weiter abgebaut werden kann (Orban & Izaurralde, 2005). Anschließend löst sich die *small* RNA vom RISC-Komplex ab, welcher dann wieder mit der nächsten miRNA oder siRNA beladen werden kann. Dies geschieht allerdings nur im Fall einer vollständigen Bindung an die Ziel-RNA. Bei *mismatches* und nicht vollständigem Binden der kleinen RNA an die Ziel-RNA, was vor allem bei miRNAs der Fall ist, kommt es nicht zu einer Hydrolyse der Ziel-RNA, sondern zu deren translationalen Repression. Es konnte noch nicht ganz im Detail geklärt werden, wie diese Repression vermittelt wird. Es wird jedoch vermutet, dass das *Silencing* der mRNA vor allem mittels eines Rekrutierens weiterer Faktoren durch die Argonaute Proteine induziert wird. Dabei spielen die GW182-Proteine eine zentrale Rolle, welche direkt mit den AGO-Proteinen interagiert und weitere Faktoren zur mRNA rekrutieren

Zu diesen zählen unter anderem die Deadenylase Komplexe PAN2-PAN3 oder CCR4-NOT, welche die Poly(A)-Deadenylation der mRNA übernehmen (Christie et al., 2013). Der Abbau der 5'-Cap Struktur erfolgt anschließend durch das *decapping protein 2* (DCP2) woraufhin eine 5'-3' Degradation der mRNA durch die Exoribonuklease 1 (XRN1) stattfinden kann (Braun et al., 2012).

1.1.5. ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE

Als Antisense-Oligonukleotid (ASO) wird ein einzelsträngiges DNA-Molekül bezeichnet, welches via Watson-Crick Basenpaarung an eine komplementäre mRNA oder miRNA binden und so Proteinexpressionen spezifisch beeinflussen kann (S. Crooke, 2005). Es existieren mehrere Mechanismen durch welche ein ASO-induzierter Protein *Knockdown* oder eine Steigerung der Translation zustande kommen kann (s. Abb. 2). Neben der Rekrutierung von RISC-Komplexen oder dem Einsetzen eines AntimiRs, stellt die Rekrutierung und Induktion der endogenen Endonuklease RNase H eine weitere Option dar. Die RNase H, welche einen entstandenen RNA-DNA Heteroduplex mittels einer 2-Metallionenkatalyse hydrolisieren kann (Rosta et al., 2011), besteht aus einer N-terminalen RNA und RNA/DNA Hybrid Bindedomäne (RHBD) aus ca. 50 Aminosäuren (Cerritelli & Crouch, 1995). Diese wird durch einen flexiblen Linker mit der C-terminalen katalytischen Domäne verbunden (H. Wu et al., 2001). Bis heute konnten zwei humane RNase H Enzyme identifiziert werden (RNase H1 und RNase H2) (Eder & Walder, 1991; Frank et al., 1998), welche sich vor allem in ihrer zellulären Lokalisation, Struktur und Expressionsrate unterscheiden (Lima et al., 2004, 2016; Y. Suzuki et al., 2010) sowie in ihrer ASO-vermittelte RNA Spaltung. Für diese scheint vor allem die RNase H1 verantwortlich zu sein, was in mehreren Studien beobachtet werden konnte (Liang et al., 2017; H. Wu et al., 2004). Die Rnase H hat eine starke Sequenzpräferenz (Kielpiński et al., 2017). Dies kann dazu führen, dass die Endonuklease bei Bindung eines ASO an seine Ziel-RNA nicht rekrutiert wird. In diesem Fall kann das Binden des ASOs zu einer sterischen Blockade führen, wodurch die ribosomalen Untereinheiten nicht mehr an die mRNA binden können und so die Translation, trotz gleichbleibender mRNA-Spiegel, vermindert wird (Johansson et al., 1994). Die sterische Blockade ist jedoch nicht so effektiv wie die Spaltung eines mRNA-Moleküls.

Neben den schon genannten Mechanismen kann durch die Bindung eines ASOs ebenfalls ein alternatives Spleißen der mRNA induziert werden, wodurch Proteinfunktionen wiederhergestellt oder auch inhibiert werden können (Peacey et al., 2012).

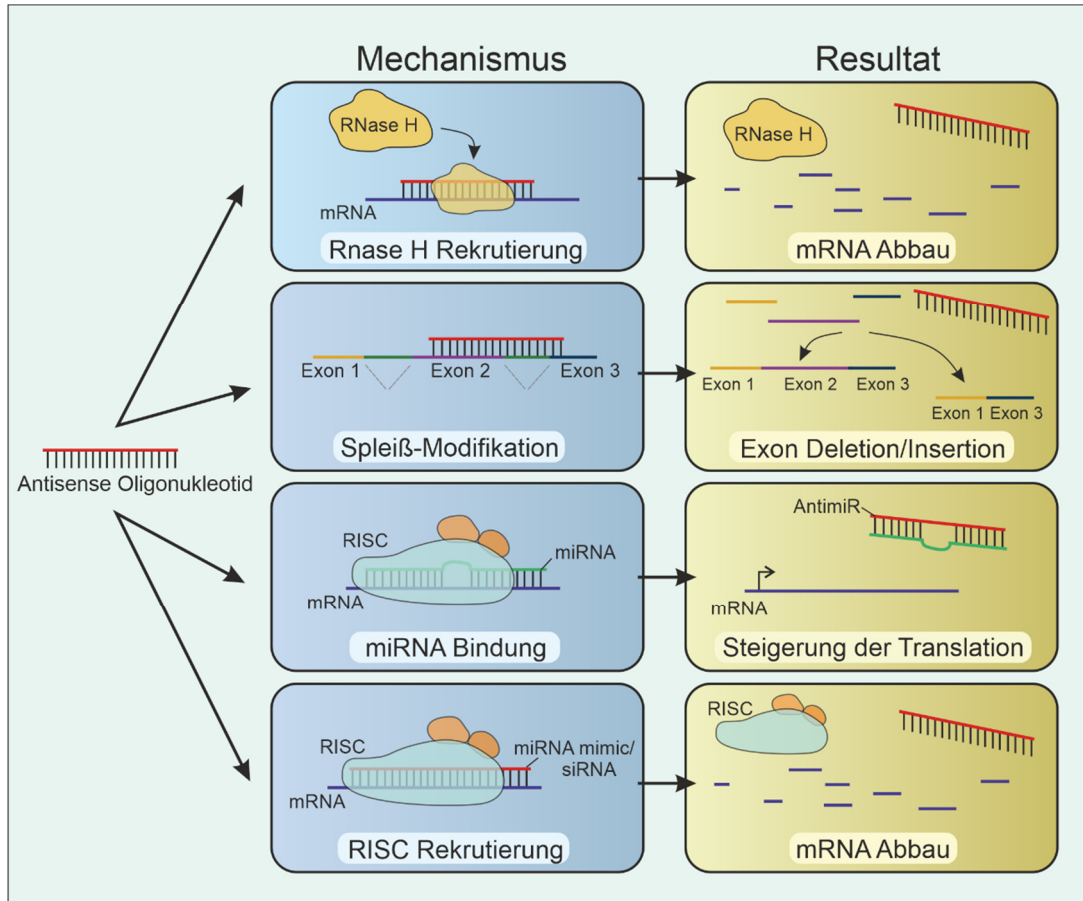


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Antisense-Mechanismen

Antisense-Oligonukleotide können über verschiedene Mechanismen ihre Effekte ausüben. Bei der RNase H und RISC-Rekrutierung kommt es zur Spaltung der Ziel-mRNA. Bei der Spleiß-Modifikation durch ein Antisense-Oligonukleotid führt dies entweder zur Exon-Deletion oder Insertion und das Einsetzen eines AntimiRs kann zur Steigerung der Translation einer Ziel-mRNA führen. (Verändert nach Schoch & Miller, 2017)

Neben einem ausführlichen Design der ASO Sequenz, was Thermostabilität, GC-Gehalt, Bindungsenergie und Zugänglichkeit der Zielsequenz mit einschließt, ist die chemische Modifikation des ASOs entscheidend für dessen Wirkung. Hierüber können Nuklease-Resistenzen, Bindungsaffinität, ein Verhindern von toxischen Nebeneffekten und das Einbringen in die Zelle verbessert werden (Shen & Corey, 2018).

Während der Entwicklung der chemisch modifizierten ASOs sind verschiedene Generationen entstanden. Bei der ersten Generation wurde innerhalb des Phosphat-

Rückgrats eines Nukleotids der nicht-brückenbildende Sauerstoff durch ein Schwefelatom ersetzt (Eckstein, 2000). Diese Phosphorothioat-Modifikation (PS-Modifikation) führt zu einer höheren Nuklease-Resistenz, jedoch ebenfalls zu einer leicht reduzierten Affinität zur mRNA, da die Schmelztemperatur des ASO-mRNA Heteroduplex herab gesetzt wird (S. T. Crooke, 2000).

Eine weitere Verbesserung der Nuklease-Resistenz sowie eine stärkere Affinität zur Ziel-RNA wurde bei der zweiten Generation der chemisch modifizierten ASOs erreicht. Dafür wurden ASOs mit einer 2'-Alkyl-Modifikation der Ribose entwickelt, wozu 2'-O-Methyl (2'-OMe) und 2'-O-Methoxyethyl (2'-MOE) Substitutionen gehören (Shen & Corey, 2018). Diese führen jedoch zu keinem RNase H vermittelten Abbau der RNA (Altmann et al., 1996), weswegen eine weitere Entwicklung dieser ASOs von Nöten war. Um eine spezifische RNA Spaltung durch die RNase H zu ermöglichen, wurden sogenannte *gapmer* ASOs entwickelt. Diese besitzen einen zentralen Bereich aus etwa 10 PS modifizierten oder unmodifizierten DNA-Nukleotiden, welche an beiden Seiten (5'- wie auch 3'-Ende) von weiteren 2'-OMe oder 2'-MOE PS modifizierten Nukleotiden umgeben sind (McKay et al., 1999). Durch diesen Aufbau wird es der RNase H ermöglicht sich an den zentralen Bereich des ASOs zu setzen, wobei die positiven Eigenschaften der 2'-Alkyl-Modifikation der ASO-Enden trotzdem erhalten bleiben.

Peptid-Nukleinsäuren (PNA), *locked nucleic acids* (LNA) und Phosphoramidat Morpholino Oligomere (PMO) gehören zur dritten Generation der ASOs und bringen weitere Verbesserung bezüglich der Biostabilität und Pharmakokinetik mit sich (Gleave & Monia, 2005; Jens Kurreck, 2003). Die PNA sind synthetische DNA-Mimik Moleküle bei welchem das Phosphodiester-Rückgrat durch einen flexibleren Pseudopeptid-Polymer (*N*-(2-aminoethyl)glycine) ausgetauscht wurde. Des Weiteren sind die Basen durch eine Methylen-Carbonyl-Bindung mit dem Rückgrat verbunden (Nielsen, 2004; Nielsen et al., 1991). Bei den PNAs handelt es sich um ungeladene Nukleotide, was zu einer besseren Affinität und Spezifität der DNA-DNA und DNA-RNA Bindung sowie zu einer höheren Biostabilität führt. Jedoch wird hierbei kein Protein *Knockdown* mittels RNase H induziert und das Einbringen in Zellen ist erschwert (Koppelhus & Nielsen, 2003; Nielsen, 2004).

Die LNA-Nukleotide weisen eine zusätzliche Methylenbrücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und 4'-Kohlenstoff auf und wurden Ende der 90er erstmals beschrieben (Obika et al., 1997; Wengel, 1999). Diese eingeschränkte Konformationsfreiheit begünstigt die

Stabilität der LNA-Nukleotide sowie eine erhöhte Affinität zum komplementären DNA oder RNA Strang (Suresh & Priyakumar, 2013). Die Stabilität wird vor allem durch eine starke Erhöhung der Schmelztemperatur und durch eine verbesserte Endo- und Exonukleaseresistenz hervorgerufen (Nagahama et al., 2009). Wie bei den PNAs sind LNA- Nukleotide kein Spaltssubstrat für die RNase H, können aber als *gapmer* Form zu einer effizienten RNA Degradation führen (J. Kurreck, 2002). Des Weiteren zeichnen sie sich im Vergleich zu den folgend beschriebenen PMOs durch ein verbessertes Einbringen in Zellen aus, was durch das negativ geladenen Rückgrat der LNA begünstigt wird.

Bei den PMO ASOs handelt es sich um ungeladene Nukleinsäuren, bei welchen der Ribosezucker durch einen 6-fachen Morpholining ausgetauscht wurde und anstelle einer Phosphodiesterbindung eine Phosphoramidatbindung besitzt (Amantana & Iversen, 2005). Auch hier wird der ASO Effekt über eine sterische Interferenz vermittelt und nicht durch die RNase H Aktivität. Die zelluläre Aufnahme ist bei den PMOs sehr ineffizient, jedoch konnte gezeigt werden, dass dies durch eine Konjugation mit *arginine-rich peptide* (ARP) deutlich verbessert werden kann (Nelson et al., 2005).

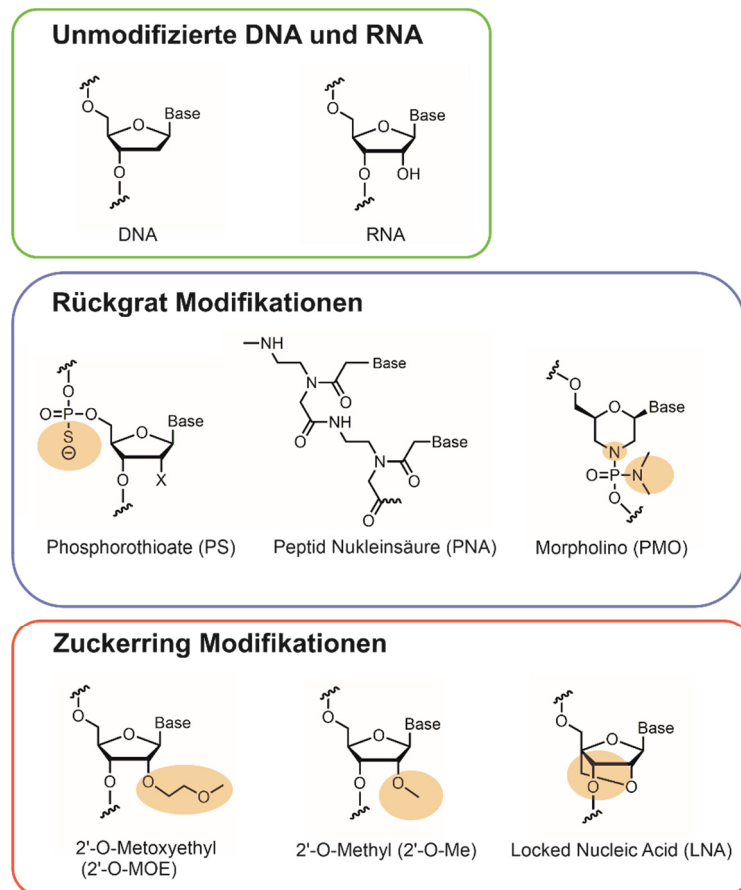


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Antisense-Oligonukleotid Modifikationen

In grün sind unmodifizierte DNA- und RNA-Nukleotide dargestellt. Die Rückgrat Modifikationen (blau) können aus Phosphorothioate (PS), Peptid Nukleinsäuren (PNA) oder Morpholino (PMO) bestehen. Bei den Zuckerring Modifikationen (rot) handelt es sich meist um 2'-O-Methoxyethyl (2'-O-MOE), 2'-O-Methyl (2'-O-Me) und *Locked Nucleic Acid* (LNA) Modifikationen.

Es gibt zurzeit einige Antisense-Oligonukleotide, die als Arzneimittel zugelassen wurden und bei verschiedenen humanen Krankheiten eingesetzt werden. Schon Ende der 90er wurde das Mittel Fomivirsen von der FDA zugelassen, welches die Translation eines Zytomegalievirus-Proteins inhibiert und somit gegen Zytomegalievirus-induzierte Retinitis eingesetzt werden konnte (Jabs & Griffiths, 2002). Im Jahr 2013 wurden zwei weitere Mittel auf den Markt gebracht, Mipomersen und Lomitapide, welche beide zur Behandlung von Hypercholesterinämie eingesetzt werden (Blom et al., 2018; Duell et al., 2016). Zur Behandlung von Muskelerkrankungen wurde 2016 Eteplirsen und Nusinersen zugelassen. Eteplirsen wird zur Behandlung der Muskeldystrophie Duchenne eingesetzt und bindet dabei an ein Exon der Dystrophin RNA, was zu einem alternativen Spleißen der RNA und einem nur eingeschränkt funktionalen Protein führt. Bei Nusinersen hingegen handelt es sich um ein ASO welches bei der Therapie gegen spinale

Muskelatrophie verwendet wird. Hierbei wird ein Exon zusätzlich in die mRNA aufgenommen, welches die Generierung von funktionslosen Proteinen verhindert und die Menge des funktionalen *survival motor neuron-2* Proteins erhöht (Goyal & Narayanaswami, 2018).

1.2. SYNTHETISCHE RIBONUKLEASEN

Eine Alternative zu Oligonukleotid-basierten Wirkstoffen, welche durch blockierende Wechselwirkungen mit der Ziel-RNA oder durch Rekrutierung zelleigener Ribonukleasen agieren, stellt der Einsatz von synthetisch hergestellten Ribonukleasen dar. Viele Oligonukleotid-Modifikationen führen dazu, dass diese nicht mehr durch die RNase H erkannt werden. Wenn ein Antisense-Oligonukleotid jedoch mit einem Molekül verbunden ist, welches die RNA nach Hybridisierung selbst schneiden kann, könnte diese Problematik umgangen werden, weshalb sich in den letzten Jahrzehnten viele Forschungsgruppen mit der Entwicklung von künstlichen Nukleasen beschäftigt haben.

Wie bei der DNA werden RNA-Nukleotide ebenfalls über eine 3'-5'-Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft. Dabei ist jedoch die Stabilität dieser Verbindungen um ein Vielfaches kleiner als bei DNA-Molekülen (Gates, 2009). Die geringere Halbwertszeit der RNA-Phosphodiesterbindung ist durch die D-Ribose Zuckereinheit bedingt. Dadurch besitzt RNA im Vergleich zur DNA in ihrem Rückgrat eine zusätzliche 2'-OH-Gruppe, welche bei der Spaltung der Phosphodiesterbindung als internes Nukleophil dienen kann. Bei der Hydrolyse des RNA-Rückgrats greift die 2'-OH-Gruppe nukleophil am Phosphoratom an, woraufhin ein 2',3'-zyklisches Phosphat entsteht, was weiter zu 2' und 3'-Phosphat hydrolysiert wird. (Lönnberg, 2011).

Viele körpereigene Nukleasen enthalten ein oder mehrere Metallionen, wie z.B. die RNase H, und es konnte gezeigt werden, dass zweiwertige Metallionen die Hydrolyse von RNA stark beschleunigen können (Eichhorn & Butzow, 1965). Dies führte dazu, dass in den letzten Jahren eine Vielzahl von metallbasierten synthetischen Nukleasen entwickelt wurden. Viele dieser künstlichen Ribonukleasen basieren auf Lanthanoidkomplexen, bei welchen eine Halbwertszeit der RNA-Substrate von ca. zwei Stunden erreicht wird (Magda et al., 1997). Noch schnellere Reaktionszeiten konnten

durch Kupfer-Phenanthrolin-Komplexe erlangt werden, welche 80 % des RNA Substrates innerhalb einer Stunde hydrolisieren konnten (Murtola et al., 2010).

Eine etwas geringere katalytische Aktivität besitzen synthetische Ribonukleasen auf der Basis von Zinkionen, welche allerdings im Hinblick auf *in vivo* Verwendungen recht interessant sind, da das intrazelluläre Zn^{2+} für die Bildung von spaltaktiven Komplexen genutzt werden könnte (Putnam & Bashkin, 2000).

Im Hinblick auf eine biologische Anwendung der metallhaltigen künstlichen Ribonukleasen sind hierbei dennoch einige Grenzen gesetzt. Die Stabilität des Metallkomplexes bedingt die Aktivität des Phosphodiester-Spalters, welche unter Umständen im zellulären Milieu verringert wird. Des Weiteren können einige der in den spaltaktiven Komplexen verwendeten Metallionen toxische Nebenwirkungen verursachen (Franklin, 2001).

Dies führte dazu, dass sich einige Forschungsgruppen mit der Entwicklung metallfreier Nukleasen beschäftigt haben, welche im Folgenden beschrieben werden.

1.2.1. METALLFREIE SYNTHETISCHE RIBONUKLEASEN

Bei der Entwicklung von metallfreien Ribonukleasen orientierte sich die Forschung an den Aminosäuren, die bei der Phosphodiesterhydrolyse durch natürliche Ribonukleasen eine wichtige Rolle spielen. Hierbei diente vor allem die RNase A als Vorbild, da diese kein Metallion als Co-Faktor benötigt (J. M. Thomas et al., 2009).

Synthetische metallfreie RNA-Spalter basieren demzufolge häufig auf Amino-, Imidazol- oder Guanidingruppen, welche eine saure oder basische Katalyse der Phosphodiesterhydrolyse ermöglichen (Piątek et al., 2004). Die metallfreien Spalter besitzen den großen Vorteil einer geringeren Toxizität und der Möglichkeit auch im zellulären Umfeld aktiv zu sein. Die Spaltaktivität der metallfreien Nukleasen liegt jedoch meist deutlich unter der von metall-basierenden Komplexen. Diese konnte allerdings durch weitere Veränderungen am Oligonukleotid-Teil verbessert werden. So konnte ein Spalter auf Basis einer Diethylentriamin (DETA) Verbindung durch Konjugation mit einem PNA-Oligonukleotid Substrate mit einer Halbwertszeit von 8 Stunden spalten (Verheijen et al., 2000). Künstliche Ribonukleasen auf der Basis von Imidazol besitzen eine hohe Abhängigkeit vom jeweiligen RNA-Substrat und konnten nur bei der

Verwendung von tRNA als Substrat ähnlich schnelle Spalt-Kinetiken hervorbringen (Beloglazova et al., 2002). Des Weiteren wurden kürzlich Konjugationen aus einem Oligonukleotid und dem Peptid Acetyl-[(Leu-Arg)2Gly]2 entwickelt, wobei ein synergistischer Effekt zwischen RNase H und dem Konjugat beobachtet sowie Effekte in Zellkultur Experimenten sowie in Mausmodellen gezeigt werden konnten (Patutina et al., 2019).

1.2.1.1. TRIS(2-AMINO BENZAMIDAZOL)

Neben Imidazol haben auch Verbindungen mit Guanidinium-Gruppen ein großes Interesse als RNA Spalt-Wirkstoffe geweckt (Komiyama & Inokawa, 1994). Guanidin ist die funktionelle Gruppe der Aminosäure Arginin und gehört zum katalytisch-aktiven Bereich einiger Nukleasen, wie z.B. der Staphylokokken-Nuklease (Cotton et al., 1979). Des Weiteren ist die Guanidinium-Gruppe eine Substruktur der Guanin Base, welche in Haarnadel-Ribozymen beim Protonentransfer von der attackierenden 2'-OH Gruppe zum Phosphoratom beteiligt ist (Rupert & Ferré-D'Amaré, 2001). Bei physiologischem pH-Wert liegen Guanidinium-Gruppen als Guanidiniumionen vor, wodurch sie in der Lage sind, in ihrer unmittelbaren Nähe die Elektronendichte zu reduzieren.

Eine Spaltaktivität von Guanidinium-Gruppen gegenüber RNA Molekülen wurde schon in den 1990er Jahren berichtet (Smith et al., 1993). Auch die Göbel Arbeitsgruppe konnte 2005 zeigen, dass ihr Guanidin-Spalter Tris(2-aminobenzimidazol) spezifisch RNA degradieren kann (Scheffer et al., 2005). In den letzten Jahren konnte die Halbwertszeit der gespalteten RNA-Substrate mit dieser artifiziellen Ribonuklease auf 10 bis 20 Stunden verringert werden (Dogandzhiyski et al., 2015). Der Wirkmechanismus der Phosphodieterspaltung beinhaltet dabei einen nukleophilen Angriff durch die 2'-OH-Gruppe an das Phosphoratom und die Bildung von 2',3'-zyklischen Phosphaten. Diese Spaltung ist dabei spezifisch für RNA und hydrolisiert keine DNA (Gnaccarini et al., 2006; Scheffer et al., 2005).

1.3. UNTERSUCHTE ONKOGENE UND PROTEINE

1.3.1. P21

Der *Cyclin-dependent kinase* (CDK) Inhibitor P21, auch unter dem Namen p21^{waf1/cip1} oder CDKN1A (Abbas & Dutta, 2009) bekannt, ist ein 165 Aminosäuren langes Protein, welches zur Familie der CIP/KIP Inhibitoren gehört (Gartel, 2006). P21 ist vor allem als Zellzyklus Inhibitor bekannt, wobei es das Fortschreiten des Zellzyklus am G1/S Phasenübergang durch Inhibition der Cycline E/CDK2 und D/CDK4 (Holland et al., 2001) vermittelt sowie den Übergang in die S-Phase (Ferrándiz et al., 2012).

Neben der Zellzyklusregulierung hat P21 einen Einfluss auf verschiedene zelluläre Reparaturmaßnahmen von strahleninduzierten DNA-Schäden (Lei et al., 2010; Macleod et al., 1995). Dabei bindet es an das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) und verhindert so die DNA Replikation und das Eintreten in die Mitose (R. Li et al., 1994). Einen Einfluss auf die Apoptose konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wobei sich dieser antagonistisch äußern kann. Bei einer Herunterregulation von P21 konnte eine erhöhte Apoptose und erniedrigte Proliferation beobachtet werden (A. Chen et al., 2015), was ebenfalls bei Antisense Experimenten gezeigt werden konnte (Polyak et al., 1996). Dieser anti-apoptotische Effekt durch P21 konnte bei Keratinozyten jedoch nur bei Abwesenheit von DNA-Schäden beobachtet werden und änderte sich zu einem pro-apoptotischen Effekt nach UV-induzierten DNA-Schäden in den Zellen (A. Chen et al., 2015). Somit agiert P21 nicht nur als Inhibitor der Zellproliferation, sondern ebenfalls als Inhibitor der Apoptose. Dieser gegensätzliche Effekt konnte auch schon bei anderen wachstumsstimulierenden Onkogenen gezeigt werden, wie bei MYC und E2F1 (Pelengaris et al., 2002; Pützer & Engelmann, 2013) und ist eng mit der zellulären Lokalisation von P21 verbunden. Diese wiederum hängt vom Phosphorylierungsstatus von P21 ab, welches an Thr-145 (durch AKT1/PKB, PKA, PKC und PIM1) und Ser-146 (durch AKT1, PIM1 und PKC) phosphoryliert werden kann (Karimian et al., 2016). Zum einen führt die Phosphorylierung an Thr-145 zur Inhibition der Interaktion von PCNA und P21, was eine verstärkte Proliferation und Defekte in der Reparatur von Basenfehlpaarungen zur Folge hat (Y. S. Jung et al., 2010). Zum anderen wird dadurch die Lokalisation von P21 im Zytoplasma stabilisiert, da sich Thr-145 innerhalb der

nuclear localization sequence (NLS) befindet und es dadurch nicht in den Nukleus transportiert werden kann (Zhou et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass P21 im Zytoplasma als Inhibitor der Apoptose fungiert, indem es die Funktion von mehreren Faktoren inhibiert, wie z.B. von *apoptosis signal regulating kinase 1* (ASK1) (Huang et al., 2003). Ebenfalls inhibiert es dort den *ROCK/LIMIK/COFILIN* Signalweg, was zu erhöhter Proliferation, Zellinvasion und Metastase der Zellen führt (S. Lee & Helfman, 2004). Die Phosphorylierung an Ser-146 führt ebenfalls zu einer verminderten Interaktion mit PCNA, vor allem jedoch zu einer starken Erhöhung der Halbwertszeit von P21, was in Glioblastomazellen gezeigt werden konnte (Y. Li et al., 2002).

P21 wird jedoch nicht nur über dessen Phosphorylierung reguliert, sondern auch über viele verschiedene Transkriptionsfaktoren und Protein-Interaktionen. Der wichtigste transkriptionelle Regulator stellt P53 dar. Dieser wird durch verschiedene Stressarten wie DNA-Schäden oder oxidativen Stress induziert und kann über zwei konservierte P53-Bindungselemente an den Promotor von P21 binden, was dessen Expression anschließend hochreguliert (Y. S. Jung et al., 2010). Des Weiteren kann P21 durch *Breast cancer susceptibility gene 1* (BRCA1) hochreguliert werden, was P53-unabhängig, wie auch P53-abhängig vermittelt werden kann (Mullan et al., 2006). Einen weiteren Effekt auf die P21 Expression besitzt der TGF β -Signalweg, welcher durch die SMAD Transkriptionsfaktoren und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) vermittelt wird. (Hu et al., 1999; Pardali et al., 2005). Eine Herunterregulation der Expression von P21 kann auch über das Proto-Oncogen MYC vermittelt werden. Dieser Effekt wird nicht direkt übertragen, sondern indirekt durch Transkriptionsfaktoren, wie MIZ-1 (S. Wu et al., 2003) oder AP4 (P. Jung et al., 2008). MYC ist ebenfalls verantwortlich für eine Hochregulation des miR-17-92 Clusters, zu welchem die miRNAs miR-17-5p und miR-20a gehören. Diese haben wiederum einen direkten Einfluss auf P21, indem sie an dessen mRNA binden und dessen Expression vermindern (Ivanovska et al., 2008; Maren Thomas et al., 2012; M. Wang et al., 2013).

1.3.2. PIM1

Das Proto-Onkogen *Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus-1* (PIM1) wurde 1984 zum ersten Mal als Integrationsstelle für das Moloney Leukämievirus beschrieben und nach diesem ebenfalls benannt (Theo Cuypers et al., 1984). Es kodiert für eine hoch konservierte konstitutiv aktive Serin/Threonin Kinase, die zusammen mit PIM2 und PIM3 die Familie der PIM-Kinasen bildet (Bachmann & Möröy, 2005).

Im Menschen ist das *PIM1* Gen auf dem Chromosom 6p21.1-p21.31 lokalisiert und besteht aus sechs Exons und fünf Introns. Aus dem 2684 bp langen mRNA Transkript werden zwei Isoformen unterschiedlicher Länge synthetisiert (Bachmann & Möröy, 2005). Diese beiden PIM1 Isoformen entstehen durch zwei alternative Translationsstart-Codons, wodurch ein 34 kDa und ein 44 kDa großes Protein zustande kommt. Beide PIM1-Proteine zeigen eine identische *in vitro* Kinase-Aktivität, jedoch weisen sie eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Zelle (Y. Xie et al., 2006) sowie unterschiedliche Halbwertszeiten auf (Saris et al., 1991). Es wird vermutet, dass die beiden PIM1 Isoformen unterschiedliche Targets phosphorylieren können, allerdings wurde dies erst in wenigen Studien untersucht (Katsube et al., 2016; Y. Xie et al., 2006; Yingqiu Xie et al., 2008) und wird meist nicht individuell für beide Proteine betrachtet.

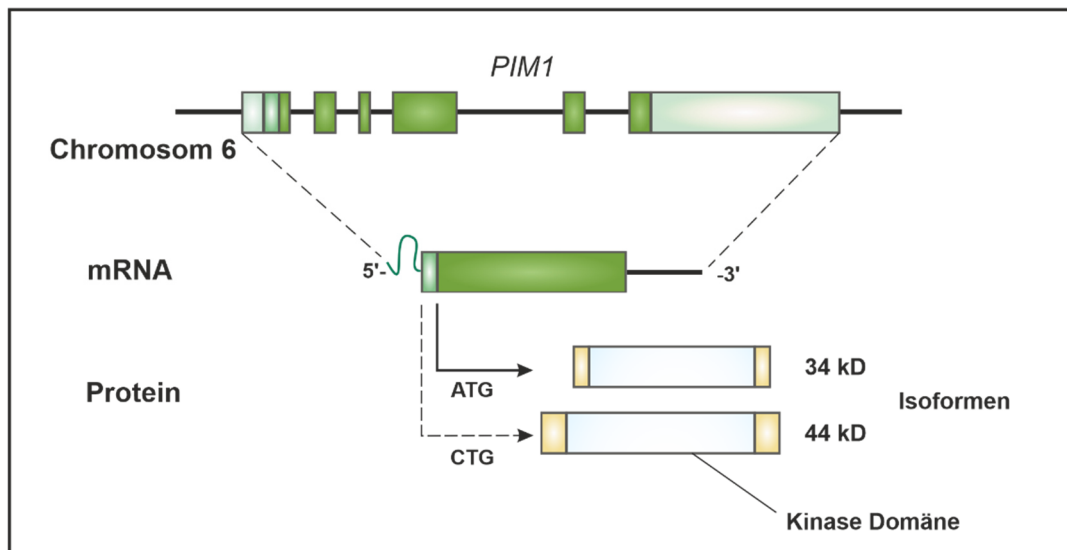


Abbildung 4: Aufbau des PIM1 Gens

Das humane *PIM1* Gen ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert und codiert 6 Exons mit langen 5'- und 3'-UTRs. Die beiden Protein Isoformen entstehen durch alternative Startcodons, besitzen jedoch beide eine aktive Kinase Domäne (Nawijn et al., 2011).

Die Regulation der PIM1 Expression wird auf mehreren Ebenen eng kontrolliert. Da PIM1 als Effektor am Ende vieler Zytokin-Signalwege agiert, wird die Kinase auf transkriptioneller Ebene vor allem durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine reguliert, wie GM-CSF, IL-3, -5, -7 und -12 (Bachmann & Möröy, 2005; Z. Wang et al., 2001). Diese aktivieren den Januskinase und *Signal Transducers and Activators of Transcription* Signalweg (Jak-STAT), welcher einen direkten Einfluss auf die PIM1 Expression hat (Miura et al., 1994; Z. Wang et al., 2001). *PIMI* mRNA Transkripte haben des Weiteren nur eine kurze Halbwertszeit, da innerhalb der 3'-UTR mehrere Kopien einer AU-reichen destabilisierenden Sequenz liegen. An diese AU-reichen Elemente (ARE) kann das Protein Tristetraprolin (TTP) binden, welches den Zerfall der mRNA beschleunigt (Mahat et al., 2012). Im Gegensatz dazu wurde ebenfalls von einer Bindung des HuR Proteins an ein ARE innerhalb der *PIMI* mRNA berichtet, welches die Stabilität der mRNA fördert (Blanco et al., 2016). Eine weitere post-transkriptionale Regulation von *PIMI* stellen miRNAs da, welche ebenfalls innerhalb der 3'-UTR binden können. Ein modulierender Effekt auf die Proteinexpression wurde mittlerweile bei verschiedenen miRNAs beschrieben, wie z.B. durch miR-33a (M. Thomas et al., 2012) oder miR-328 (Eiring et al., 2010). Eine effektive Herunterregulation der Proteinexpression konnte ebenfalls durch die siRNA1491 gezeigt werden, welche wie die schon genannten miRNAs an die 3'-UTR der *PIMI* mRNA binden kann (Weirauch et al., 2013).

Auch auf translationaler Ebene wird die Expression des Onkogenes reguliert. Eine lange GC-reiche Region innerhalb der 5'-UTR sorgt für eine Cap-abhängige Translation (Hoover et al., 1997) und dient als Bindestelle für den *eukaryotic translation initiation factor 4E* (EIF4E), welcher den Export aus dem Nukleus induziert sowie zu einer Erhöhung der Translation führt (Culjkovic et al., 2006).

Da PIM1 eine konstitutiv aktive Kinase ist, braucht sie keine weitere post-translationale Modifikation für ihre Aktivität. Allerdings wird auch auf dieser Ebene die Protein-Stabilität und Aktivität reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung durch die Tyrosin-Kinase ETK an Stelle Y218 zu einer erhöhten PIM1-Kinase Aktivität führt (O. Kim et al., 2004). Im Gegensatz dazu führt eine Bindung von PIM1 an die Serine/Threonin Protein Phosphatase 2A (PP2A) zur Dephosphorylierung, Ubiquitinierung und schließlich zum proteasomalen Abbau von PIM1 (Losman et al., 2003; Ma et al., 2007). Ein Stabilitäts-Einfluss durch verschiedene *heat shock* Proteine (HSP) konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Hierbei führt eine Bindung mit HSP90 zu

einer Stabilisierung der PIM1-Proteinspiegel (Mizuno et al., 2001), wohingegen HSP70 an ubiquitinylierte PIM1-Proteine bindet und deren proteasomalen Abbau fördert (Shay et al., 2005). In 2017 konnte gezeigt werden, dass PIM1 auch von *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) an zwei unabhängigen Positionen modifiziert wird, was nicht nur einen Einfluss auf den Proteinspiegel, sondern auch auf die Kinaseaktivität besitzt. Des Weiteren wird vermutet, dass durch die Sumolierung eine Veränderung der Substratspezifität ausgelöst wird (Iyer et al., 2017).

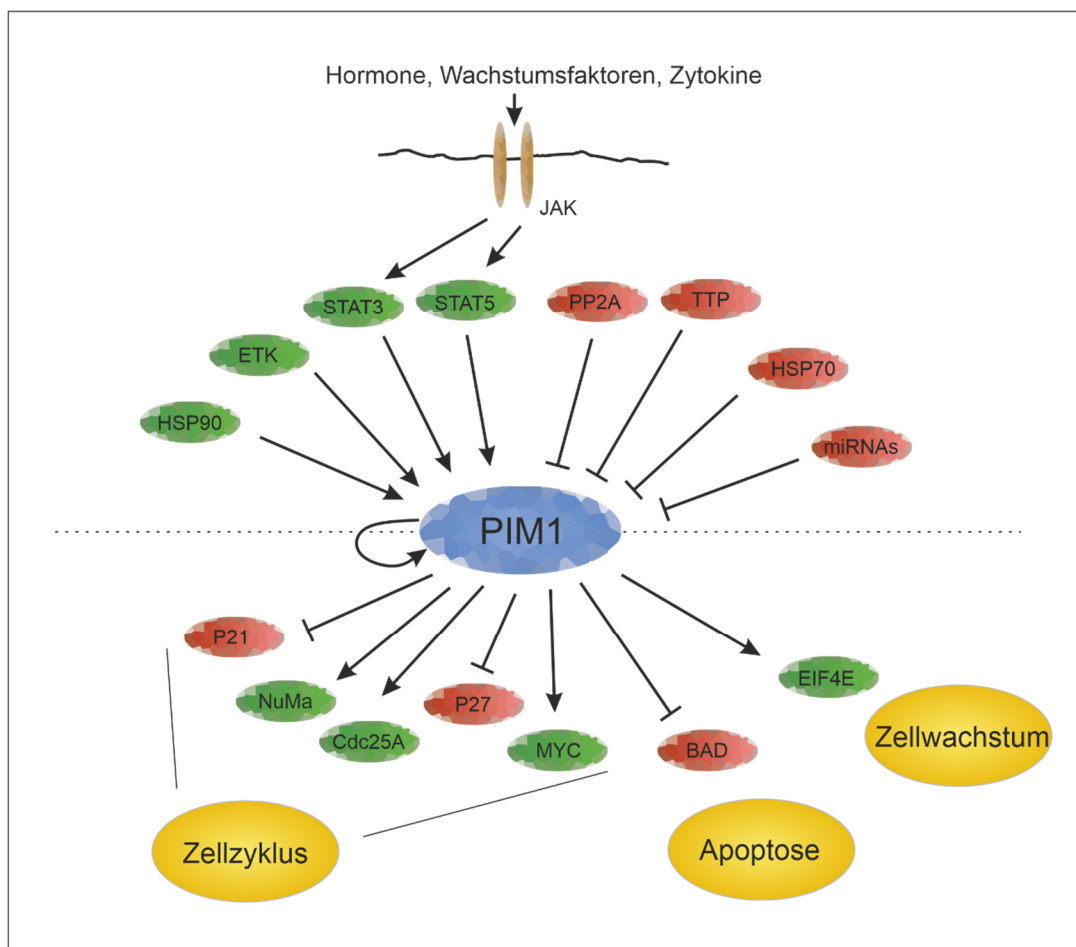


Abbildung 5: Regulations-Netzwerk um PIM1

PIM1 wird durch verschiedene Faktoren, wie Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren über den JAK/STAT Signalweg direkt induzierend reguliert. Ebenfalls miRNAs, wie miR33a, oder HSP-Proteine haben einen direkten Effekt auf die Expression und Stabilität von PIM1. Die Phosphorylierungstargets von PIM1 können induzierend wie auch inhibierend durch die Phosphorylierung reguliert sein (grün oder rot), was einen Einfluss auf den Zellzyklus, Apoptose und das Zellwachstum hat.

Die PIM-Kinasen werden in vielen Geweben exprimiert, wie z.B. im Knochenmark, Thymus, Niere, Prostata oder Hippocampus (Eichmann et al., 2000).

Hierbei spielt PIM1 eine große Rolle bei der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Tumorgenese (Z. Wang et al., 2001), was durch die vielen verschiedenen Substrate vermittelt wird, welche in der Regulation der oben genannten Vorgänge beteiligt sind. In 2004 konnte gezeigt werden, dass das Protein Bad durch PIM1 phosphoryliert werden kann und es somit einen indirekt positiven Einfluss auf das Überleben der Zelle hat (Aho et al., 2004). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass P21 und P27 Phosphorylierungstargets sind (Morishita et al., 2008; Zeping Wang et al., 2002) und die Aktivität der Phosphatase Cdc25A, welche den G1 Zellzyklus reguliert, durch PIM1 erhöht werden kann (Mochizuki et al., 1999).

Neben der Regulation der G1- und S-Phase konnte ebenfalls ein Einfluss auf die Mitose nachgewiesen werden, wobei PIM1 das Protein *nuclear mitotic apoptosis protein* (NuMA) modifiziert, welches für den Zusammenbau des Spindelapparates verantwortlich ist (Bhattacharya et al., 2002). Aber auch außerhalb des Zellzyklus konnten potentielle PIM1 Substrate identifiziert werden, wie HP1 oder PAP1, welche in der Gen-Stilllegung und Regulation von mRNA Spleißung eine wichtige Rolle spielen (Koike et al., 2000; Maita et al., 2000).

Ein weiteres Target, das Onkogen MYC, zeigt eine erhöhte transkriptionelle Aktivität sowie eine verlängerte Halbwertszeit nach einer Phosphorylierung durch PIM1 (Pasqualucci et al., 2001; J. Wang et al., 2012).

Die onkogene Eigenschaft des *Pim1* Gens wurde durch dessen Überexpression in transgenen Mäusen identifiziert, da es hierbei in einigen Tieren Lymphome induzieren konnte (Theo Cuypers et al., 1984; van Lohuizen et al., 1989). Da die Häufigkeit der entstandenen Lymphome allerdings nicht sehr hoch war, kann man *Pim1* für sich allein nur als schwaches Onkogen betrachten. In Kombination mit einer Überexpression des Onkogens MYC führte dies allerdings zu einer 100 %igen Todesrate der im Experiment verwendeten Mäuse (Verbeek et al., 1991). Dieser synergistische Effekt sowie die Rolle von PIM1 innerhalb der Krebsentstehung wurde daraufhin auch in mehreren humanen Krebsarten gefunden, wie in verschiedenen Leukämie- und Lymphom Varianten sowie bei Pankreas-, Leber-, Mund-, Prostata-, und Darmkrebs (Magnuson et al., 2010; Shah et al., 2008; Weirauch et al., 2013). PIM1 dient mittlerweile bei einigen Tumorarten als Diagnostik- und Prognosemarker, da dessen erhöhte Protein- sowie mRNA-Expression in Tumoren unter anderem mit einem ernsteren und schwerer zu behandelnden

Krankheitsverlauf in Zusammenhang gebracht werden konnte (Magnuson et al., 2010). Interessanterweise fanden Mikkers *et al.* in 2004 heraus, dass *knockout* Mäuse, in welchen alle drei Pim-Kinasen deaktiviert sind, nur einen leicht veränderten Phänotyp zeigen und immer noch lebensfähig sowie fruchtbar sind (Mikkers et al., 2004). Dies macht PIM1 als Wirkstoffziel in der Krebstherapie sehr attraktiv und einige PIM1 Inhibitoren befinden sich mittlerweile schon in präklinischen sowie klinischen Studien (Tursynbay et al., 2016; X. Zhang et al., 2018). Eine weitere Targeting-Strategie neben Kleinmolekül-Inhibitoren ist eine negative Regulation der PIM1-Proteinspiegel, was im Falle von siRNA und der miRNA miR-33a im Xenograft Mausmodel gezeigt werden konnte und einen negativen Effekt auf das Tumorwachstum hatte (Ibrahim et al., 2011).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardlaborchemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Merck KG (Darmstadt), Sigma Aldrich (Taufkirchen), GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) mit dem Reinheitsgrad pro analysi (p. a.) oder in chemisch reiner Qualität bezogen. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer wird im jeweiligen Materialteil angegeben und werden, wenn nicht anderes beschrieben, mit doppelt-destilliertem Wasser (ddH_2O) hergestellt sowie gegebenenfalls zur längeren Haltbarkeit sterilfiltriert.

Alle verwendeten Materialien, die in Kontakt mit Nukleinsäuren sowie pro- und eukaryotischen Zellen kommen, werden vor der Verwendung autoklaviert (121 °C bei 1.0 bar).

2.1.1. VERBRAUCHSMATERIALIEN

In der folgenden Tabelle werden die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller angegeben.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platte MicroAmp™ Fast Optical, 0.1 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96-Well-Platte weiß	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
24-Well-Platte (FC, Standard)	Sarstedt, Nümbrecht
12-Well-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Carestream® BioMax® light film	Kodak, New York, USA
Deckgläschen 22 cm x 22 cm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmaltransferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalpipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht

Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
Flaschenaufsatzfilter 500 mL, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Glasperlen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Handschuhe, Nitril	SATRA Technology Center, Ketterin UK
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago USA
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Multiply®-µStrip Pro 0,2 mL	
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen 92 × 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Membran Immobilon-P	Merck, Darmstadt
Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubenröhrchen 5 mL, 10 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter Filtopur S, 0.2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman Papiere 7 x 8,4 cm	BioRad, Hercules USA
Zellkulturflasche 25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugalfilter, Nylon 0,2 µm	VWR International, Radnor USA

2.1.2. ENZYME

Aus Tabelle 2 können die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme entnommen werden.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
2x Phusion PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
5x HOT CYTOPol Blend Master Mix (mit 10 mM MgCl ₂)	Cytogen GmbH, Wetzlar
10 x Trypsin/EDTA-Lösung	Merck, Darmstadt
FastAP Thermosensitive alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest <i>DpnI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest <i>KpnI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest <i>EcoRI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastAP Thermosensitive alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FBS Superior	Merck, Darmstadt
Pfu DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protease inhibitor cocktail III, EDTA-frei	Merck, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4-Polynukleotidkinase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.3. PUFFER UND LÖSUNGEN

Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
10x FastDigest-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x Pfu-DNA-Polymerase-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10 x PNK-Puffer A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

10 x FastAP-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ampicillin-Lösung	100 mg/mL Ampicillin-Na
Acrylamide M-Bis 50 %	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Bradford-Reagenz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
5 % BSA-Lösung	5 g BSA Ad 100 mL 1x TBST-Puffer
Carestream® Entwickler Lösung	Kodak, New York, USA
Carestream® Fixierer Lösung	Kodak, New York, USA
Clarity Western ECL Reagenz	BioRad, Hercules USA
Kinetik-Puffer	50 mM Tris pH 8
Lyse-Puffer	125 mM Tris HCl pH 6,8 4 % SDS 1,4 M 2-Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau
1x PBS Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
5 % Milchpulver-Lösung	5 g Milchpulver Ad 100 mL 1x TBST-Puffer
RIPA-Puffer	Merck, Darmstadt
RNA-Proben-Puffer	66 % deionisiertes Formamid 2,6 M Urea 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,02 % (w/v) Xylencyanol 2x TBE-Puffer
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti-Aqua-Phenol, Roti-Phenol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,6 % SDS
SignalFire ECL Reagenz	Cell Signaling Technology, Danvers USA
Stripping Lösung	62,5 mM Tris HCl pH 6,7 100 mM 2-Mercaptoethanol 2 % SDS
20 x TBS-Puffer	200 mM Tris HCl pH 7,6 3000 mM NaCl
TBST Puffer	1x TBS-Puffer 0,1 % Tween 20
Transfer-Puffer	25 mM Tris HCl pH 8,3 192 mM Glycin 10 % Methanol
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris HCl pH 8,8 0,6 % SDS
Western Lightning™ Plus Reagent	PerkinElmer, Massachusetts, USA

2.1.4. SPEZIFISCHE CHEMIKALIEN

Die spezifischen Chemikalien die in dieser Arbeit verwendet wurden, können aus Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten spezifischen Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
[γ - ³² P]-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lipofectamine TM 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lipofectamine TM 3000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ribonukleosidtriphosphate (rNTPs)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GelRed TM	Biotium, Fremont USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.1.5. GERÄTE

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav V-95	Systec GmbH, Linden
Bakterien-Brutschrank BE400	Memmert, Büchenbach
Bi-Destillierapparat Destamat	Heraeus, Hanau
Brutschrank	NuAire, Plymouth USA
Agarose-Elektrophoresekammer PerfectBlue TM Mini S und L	VWR International, Radnor USA
Gel-Dokumentation Gerix 1000	Biostep, Burkhardtsdorf
Gel-Dokumentation ChemiDoc MP	BioRad, Hercules USA
Heizblock Biometra TB2	Analytik Jena AG, Jena
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge Fresco 17	Heraeus, Hanau

Lichtmikroskop DM IL LED	Leica, Wetzlar
Mikrotiterplatten-Reader Safire II	Tecan, Männedorf Schweiz
Mikrowelle 8020E	Privileg, Benton Harbor USA
Mini-PROTEAN® Gelgießstände	BioRad, Hercules USA
pH-Meter Inolab	WTW, Weilheim
Pipetten Pipetman	Gilson, Limburg an der Lahn
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GMBH + CO KG, Wertheim
Reinluftwerkbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rollenmischer	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
Rührer Yellow Line	IKA, Staufen im Breisgau
Safire2™	Tecan, Crailsheim
Schüttelinkubator 3033	GFL, Burgwedel
SDS-Elektrophoresekammer	BioRad, Hercules USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	
Spannungsquelle PowerPac 3000	BioRad, Hercules USA
Spektralphotometer UV5Nano	Mettler-Toledo, Columbus USA
Tischzentrifuge Universal 320	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler Biometra Thermo	Analytik Jena AG, Jena
Thermocycler Biometra Tone	Analytik Jena AG, Jena
Thermocycler Life ECO	Bioer Technology, Hangzhou China
Trans-Blot Turbo	BioRad, Hercules USA
Wasserbad	neoLab Migge GmbH, Heidelberg

2.1.6. GRÖSSENSTANDARDS

Die verwendeten Größenstandards können aus Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
TriDye™ 100 bp DNA	NEB, Frankfurt am Main
TriDye™ 1 kb DNA	NEB, Frankfurt am Main
O'RangeRuler 20 bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Leiter</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>RiboRuler Low Range RNA Leiter</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.7. KITS

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Wisconsin, USA
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HiScribeT7 High Yield RNA Synthesis	NEB, Frankfurt am Main
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	NEB, Frankfurt am Main
NucleoSpin® miRNA Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Venor®GeM Classic	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Walldorf

2.1.8. KULTURMEDIEN

Alle verwendeten Kulturmedien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Kulturmedien

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
IMDM Medium L-Glutamine, 25 mM HEPES	Lonza Group AG, Basel Schweiz
RPMI Medium 1640 L-Glutamine	Lonza Group AG, Basel Schweiz
Opti-MEM™ Minimalmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LB-Agar-Medium	15 g Agar-Agar ad 1 L LB-Medium
LB-Medium	5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 5 g Pepton ad 1 L dH ₂ O; pH 7.5

2.1.9. ANTIKÖRPER

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper können aus Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti Argonaute 2 (C34C6) Rabbit	Cell Signaling, Danvers USA
Anti Pim-1 (C93F2) Rabbit	Cell Signaling, Danvers USA
Anti p21 Waf1/Cip1 (12D1)	Cell Signaling, Danvers USA
Anti-rabbit IgG, HRP-linked #7074	Cell Signaling, Danvers USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked #7076	Cell Signaling, Danvers USA
Anti β -Actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas USA

2.1.10. OLIGONUKLEOTIDE UND PLASMIDE

Im folgenden Abschnitt werden alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Plasmide aufgeführt.

2.1.10.1. PRIMER

Alle verwendeten Primer wurden bei der Firma Metabion als 100 µM Lösung bestellt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'- 3'
siRNA v1 fwd	agg aat tct aat acg act cac tat tag gga tcc tgc tgt atg ata tgg tg
siRNA v1 rev	agc ggt acc tag gac ccc tgg aga gtc
siRNA final fwd	gcg atg ctt gat aca gga aca aca t
siRNA final rev	tgc tcg aaa gga ata tct cca cac ac
Primer 18	ggg cct ggg atc tgg aat
Primer 17	ggg cct ggg atc tgg aa
Primer 16	ggg cct ggg atc tgg a
Primer 15	ggg cct ggg atc tgg
qPCR Primer	Sequenz 5'- 3'
P21 fwd	ggt gga cct gga gac tc
P21 rev	gct tcc tct tgg aga aga tc
PIM1 fwd	atc agg ggc cag gtt ttc t
PIM1 rev	ggg cca agc acc atc taa t
miR-20a fwd	gcc gcc cta aag tgc tta ta
Universal rev	gtg cag ggt ccg agg t
β-Aktin fwd	cca acc gcg aga aga tga
β-Aktin rev	cca gag gcg tac agg gat ag
U 6 fwd	gct tcg gca gca cat ata cta aaa t
U 6 rev	ata tgg aac gct tca cga att tg
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.10.2. siRNA UND GAPMER

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten siRNA und GapmeR

Bezeichnung	Sequenz 5'- 3'	Hersteller
RNA Duplex Pim1-siRNA1491	gga aca aca uuu aca acu cTT gag uug uaa aug uug uuc cTT	Metabion, Planegg
Silencer Negative Control #1 siRNA	---	Ambion gmbH I Kassel, Kaufungen
Antisense LNA TM GapmeR NM_001243186	gag ttg taa atg ttg	Qiagen, Hilden

2.1.10.3. MODIFIZIERTE LNA- UND MIXMER-OLIGONUKLEOTIDE

Tabelle 12: Auflistung der modifizierten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Hersteller
Projekt synthetische Nuklease		
DNA Kontrolle M O	tca caa cct cct aga	Metabion, Planegg
Kontrolle M K	⌘-- tca*ca*ac*ct*cc*ta*ga	Eurogentec, Lüttich Belgien Konjugation AK Göbel
Oligonukleotid 4	gag*tt*gt*aa*at*gt*tg	Eurogentec, Lüttich Belgien
Kontrolle 16	⌘--ctc*ct*ga*ca*cg*gt*at	Eurogentec, Lüttich Belgien Konjugation AK Göbel
Konjugat 12	⌘--gag*tt*gt*aa*at*gt*tg	Eurogentec, Lüttich Belgien

		Konjugation AK Göbel
	Projekt RISC Rekrutierung	
Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Hersteller
miR LNA	t*c*a*g*t*a*c*t*c*a*g*t*a*c*	Eurogentec, Lüttich Belgien
Biotin-LNA 4	Biotin-(TEG)- c*t*a*t*a*a*g*c*a*c*t*u* t*a*	Konjugation AK Göbel
mirVana™ miRNA mimic – hsa-miR-33a- 5p	---	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Adapter 8	g*a*g*t*t*g*t*a*a*a*t*g*t*t*g*— Linker— c*t*a*t*a*a*g*c*a*c*t*u*t*a*	Eurogentec, Lüttich Belgien
Adapter 9	gag*tt*gt*aa*at*gt*tg—Linker— c*t*a*t*a*a*g*c*a*c*t*u* t*a*	Eurogentec, Lüttich Belgien
Adapter 9 Mixmer short	gag*tt*gt*aa*at*gt*tg—Linker— c*t*a*t*a*a*g*c*	Eurogentec, Lüttich Belgien
DNA Kontrolle M O	tca caa cct cct aga aag agt aga	Metabion, Planegg
Adapter 7	c*t*c*t*t*c*t*c*c*t*g*a*c*a*— Linker— t*c*a*g*t*a*c*t*c*a*g*t*a*c*	Eurogentec, Lüttich Belgien
Kontrolle M Bi	tca*ca*ac*ct*cc*ta*ga—Linker— a*c*c*a*c*t*c*t*	Eurogentec, Lüttich Belgien
Adapter 21	gag*tt*gt*aa*at*gt*tg—Linker— c*t*a*c*c*t*c*a*	Eurogentec, Lüttich Belgien
Kontrolle 2	gag*tt*gt*aa*at*gt*tg—Linker— a*c*c*a*c*t*c*t*	Eurogentec, Lüttich Belgien
Kontrolle 3	gag*tt*gt*aa*at*gt*tg—Linker— a*c*t*a*g*g*a*t*	Eurogentec, Lüttich Belgien

M let7	tca*ca*ac*ct*cc*ta*ga—Linker— c*t*a*c*c*t*c*a*	Eurogentec, Lüttich Belgien
K Bi	a*c*c*a*c*t*c*t*	Eurogentec, Lüttich Belgien
K let7	c*t*a*c*c*t*c*a*	Eurogentec, Lüttich Belgien

Die mit * gekennzeichneten Basen sind LNA Nukleotide
Die großgeschriebenen Basen besitzen 2'OMe Modifikationen

2.1.10.4. RNA SUBSTRATE

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Herstellung
155-mer	agggauccugcuguaugauaugguguguggagauauuccuuu cgagcagcgaugcuugauacaggaacaacauuacaacucau uccagaucccaggccccuggaggcugccuccaacaagugggga agagugacucuccagggguccuagguac	T7 Transkription Hausprotokoll
412-mer	gguccaccuccacagccugucgcccggggcccagcaauagcag ccuuucuggcagguccucccucucuuugucagauagcccagg gaggggaagcuucugucuccagcuuccgaguccagugacac gucucgccaagcaggacagugcuugauacaggaacaacauua caacucauuccagaucccaggccccuggaggcugccuccaac aguggggaagagugacucuccagggguccuaggccucaacuc cucccauagauacucucucucucucucucucucucucucuc uggacgauaucggaucggggggcggcagucagcagaggccug caugcaagcuuggcguaaucauggucucucucucucucuc ugaaauuguuauccgcucacaauuccaca	T7 Transkription mit HiScribe T7 Kit. Templat: PCR- Produkt von AK Göbel (Zellmann et al., 2019)

2.1.10.5. PLASMIDE

Im folgenden Abschnitt sind die verwendeten Plasmide aufgelistet und beschrieben.

pUC19 Vektor

Der Vektor Puc19 weist eine Länge von ca. 2.6 Kilobasen (kb) und besitzt eine Ampicillin-Resistenz. Des Weiteren zeichnet er sich durch eine *multiple-cloning-site* aus,

welche 54 Basen lang ist und von 13 verschiedenen Endonukleasen geschnitten werden kann. Dieser Vektor wurde zur Herstellung des RNA-Substrats 155 für die Spaltassays verwendet.

psiCHECKTM-2 Vektor

Mit Hilfe des psiCHECKTM-2 Vektors kann die Expression eines Targetgens durch einen Reporter analysiert werden. Hierbei handelt es sich um die Renilla Luciferase (hRluc), welche sich als primäres Reportergen *upstream* der *multiple-cloning-site* befindet. Somit kommt es im Fall einer Spaltung oder sterischen Blockade des eingefügten mRNA Bereichs zu einer Verminderung der Reporter Aktivität. Als Transfektionskontrolle wird die Firefly Luciferase verwendet, durch welche die Reporteraktivität der Renilla Luciferase auf Transfektionseffizienz und Zellanzahl normalisiert werden kann. Das Renilla Luciferase Gen wird durch einen SV40 Promotor reguliert; die Firefly Luciferase Expression durch einen HSV-TK Promotor. Des Weiteren ist das psiCHECK-2 Plasmid ca. 6.3 kb groß und trägt eine Ampicillin-Resistenz. In dieser Arbeit wurde das Plasmid für die Luciferase Assays im RISC-Umleitungs-Projekt verwendet.

pCW8 GFP-Vektor

Der pCW8 Vektor ist ein Derivat des pBluescript II SG (-) Vektors und weist eine Länge von 3704 bp auf (Lewis & Errington, 1996). Innerhalb des Vektors befindet sich das *gfp* Gen, welches für das *green fluorescent protein* (GFP) codiert (weitere Angaben sind in der Doktorarbeit von Michael Weber zu finden).

2.2. METHODEN

2.2.1. ZELLKULTUR

Alle Experimente mit eukaryotischen Zellen werden in einer Reinluftwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung, sowie die Inkubation während der Experimente finden unter befeuchteter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank statt.

Um einen guten Zustand der Zelllinien zu gewährleisten und ein Überwachsen innerhalb der Zellkulturflasche zu verhindern, werden die Zellen mehrere Male innerhalb einer Woche passagiert. Dafür werden diese, wenn nicht anders angegeben, zuerst mit vorgewärmten 1x PBS Puffer gewaschen, wodurch tote Zellen und Stoffwechselprodukte entfernt werden. Im Anschluss folgt eine Trypsin/EDTA (0, 25 % (w/v) Trypsin, 0,53 mM EDTA) Inkubation von 2,5 min bei 37 °C im Brutschrank. Dadurch werden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst und können im jeweiligen Medium aufgenommen werden. Danach folgt eine Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min und ein Absaugen des Überstandes. Das Zellpellet wird in 2 mL Medium gelöst und ein Teil der Zellsuspension wird zusammen mit frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.1. ZELLINIEN

SKOV3

Die adhärente Zelllinie SKOV3 stammt von einem ovariellen Adenokarzinom ab und wurde 1970 etabliert (Fogh et al., 1977). Die Zellen werden in IMDM Medium mit 10 % FCS kultiviert und werden zwei bis drei Mal die Woche passagiert.

K562

Die Suspensionszelllinie K562 entstammt einer 53-jährigen Frau mit chronischer myeloischen Leukemie (Drexler, 1994). Diese schnell wachsende Zelllinie wird in RPMI Medium mit 10 % FCS kultiviert, wobei hier kein Ablösen der Zellen nötig ist. Für das Passagieren, welches drei Mal die Woche durchgeführt wird, werden die Zellen aus der Zellkulturflasche entnommen und nach der Zentrifugation 1:10 verdünnt.

HeLa

Die adhärente Epithelzelllinie HeLa stammt aus einem Cervixtumor einer 31-jährigen Frau und wurde 1951 als erste permanente, humane Zelllinie etabliert (Scherer et al., 1953). Die Zellen werden in IMDM Medium mit 10 % FCS kultiviert und zwei Mal wöchentlich passagiert.

2.2.1.2. BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Um die genaue Zellzahl pro Milliliter für ein Experiment bestimmen zu können, wird diese mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Hierfür werden 10 µL einer Zellsuspension mit einem jeweiligen Volumen Trypanblau-Lösung versetzt. Dadurch ist es möglich tote von lebendigen Zellen zu unterscheiden. Von der Zell-Trypanblau-Lösung werden dann 10 µL zur Auszählung unter dem Lichtmikroskop weiter verwendet. Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach folgender Formel:

$$\Sigma \cdot V \cdot K = \text{Zellen pro Milliliter}$$

Σ = Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat

V = Verdünnungsfaktor

K = Kammerfaktor der Neubauerzählkammer (1000)

2.2.1.3. TRANSFEKTION

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Hierbei ist zu unterscheiden zwischen einer transienten und einer stabilen Transfektion. Bei einer transienten Methode wird das fremdgenetische Material nur zeitweise in die Zelle gebracht, wohingegen bei einer stabilen Transfektion dieses dauerhaft ins Genom eingebaut wird. Die hier beschriebenen Methoden zählen alle zu den transienten Transfektionsarten.

2.2.1.3.1. ELEKTROPORATION

Für die Elektroporation werden die Zellen zuerst zweimal mit dem Minimalmedium Opti-MEMTM gewaschen und anschließend $8 \cdot 10^6$ Zellen in 500 μ L aufgenommen. Jeweils 100 μ L der Zellsuspensionslösung werden auf 4 mm Küvetten verteilt, die jeweilige Menge an DNA oder RNA hinzugegeben und bei 330 V für 10 Millisekunden (ms) elektroporiert. Anschließend werden die 100 μ L Zellsuspension zu 1,9 mL vorgewärmten IMDM mit 10 % FCS in einem 12-Well überführt und für 48 bis 72 Stunden weiter im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.3.2. LIPOFECTAMINETM2000/3000

Das kationische-Lipid Transfektionsreagenz Lipofectamine bildet mit dem negativ geladenen Rückgrat von Oligonukleotiden einen Komplex aus. Diese ausgebildeten „Liposomen“ können sich mit der negativ geladenen Plasmamembran von Zellen verbinden und so die verpackte DNA oder RNA in das Zytoplasma entlassen.

LipofectamineTM 2000 bei Suspensionszelllinie K562

Die Transfektionseffizienz bei Suspensions-Zelllinien wie K562 ist gewöhnlich nicht so hoch wie bei adhärenenten Zelllinien. Deswegen wird hierbei das Transfektionsprotokoll abweichend von den Herstellerangaben durchgeführt, um den Kontakt der Zellen mit den Lipofectamine-DNA/RNA Komplexen zu erhöhen. Zuerst wird das Oligonukleotid-Lipofectamine Gemisch hergestellt. Dafür wird die jeweilige DNA oder RNA in dem Minimalmedium Opti-MEMTM in einem Volumen von 50 μ L verdünnt. Danach wird die Lipofectamine Verdünnung hergestellt, wobei für jedes Well 2 μ L Lipofectamine mit 48 μ L Opti-MEMTM gemischt wird. Beide Ansätze werden zusammengefügt, sodass pro Well 100 μ L Transfektionsansatz vorliegen und diese für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer 24-Well-Platte werden pro Well $5 \cdot 10^5$ Zellen in einem Volumen von 400 μ L Opti-MEMTM Medium pipettiert. Nach der Inkubation werden zu den K562 Zellen je 100 μ L Transfektionsansatz tropfenweise hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Nach 5 Stunden wird jedes Well mit 1,5 mL IMDM

Medium mit 10 % FCS aufgefüllt und die Zellen je nach Experiment nach 48 oder 72 Stunden geerntet.

Lipofectamine™ 2000 bei HeLa-Zellen

Bei der Transfektion von HeLa-Zellen werden diese am Vortag der Transfektion in eine 24-Well-Platte eingesät. Dabei werden pro Well $7 \cdot 10^4$ Zellen in 500 µL IMDM Medium mit 10 % FCS eingesetzt. Nach 24 Stunden werden jeweils 50 µL der DNA/RNA Verdünnung, sowie 50 µL der Lipofectamine Verdünnung in Opti-MEM™ für jedes Well vorbereitet. Hierbei werden 2,5 µL/Well Lipofectamine verwendet. Anschließend werden diese Vorverdünnungen gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das IMDM Medium, in welchem die HeLa-Zellen über Nacht kultivieren, wird durch 400 µL Opti-MEM™ Medium ausgetauscht und 100 µL der jeweiligen Transfektionsansätze hinzugegeben. Nach 4-5 Stunden wird das Medium wieder abgesaugt und die Zellen mit 500 µL IMDM mit 10 % FCS weiter kultiviert. Nach 48 oder 72 Stunden werden die Zellen für die weitere Untersuchung geerntet.

Lipofectamine™ 3000 bei HeLa-Zellen

Das Lipofectamine™ 3000 Reagenz induziert laut Hersteller gegenüber der 2000 Variante weniger toxische Nebeneffekte, die durch die Transfektion zustande kommen. Hierbei wird die Transfektion nach Herstellerangaben durchgeführt. Der 50 µL Transfektionsansatz wird mit 1,5 µL Lipofectamine pro Well hergestellt und zu 450 µL IMDM Medium mit 10 % FCS hinzugegeben. Anschließend werden die Zellen 48 bis 72 Stunden weiter kultiviert und dann zur Analyse geerntet.

2.2.1.4. TEST DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ

Je nach Zellart gibt es verschiedene Möglichkeiten eine Zelllinie zu transfizieren. Der Hauptunterschied liegt bei humanen Krebszelllinien darin, ob die Linie adhärent oder als Suspensionszelllinie vorliegt. Letztere lässt sich im Allgemeinen schwerer transfizieren und meist kann nur eine Elektroporation durchgeführt werden. Da bei dieser Methode jedoch ein großer Materialverlust einhergeht, wurde in dieser Arbeit ein verändertes Lipofectamine Protokoll getestet und mit Hilfe eines GFP Reporters quantifiziert.

Hierfür werden $6 \cdot 10^5$ K562-Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte vorgelegt und in einem Volumen von 400 μL aufgenommen. Dabei handelt es sich entweder um RPMI Zellkulturmedium oder Opti-MEMTM Minimalmedium. Anschließend werden 0,5 μg oder 1,2 μg GFP-Plasmid in 50 μL des jeweilig verwendeten Mediums verdünnt und mit 50 μL einer Lipofectamine Lösung (2 μL /Well) vermischt. Pro Well werden 100 μL Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und diese für 15 min oder 30 min bei 37 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Nach einer Inkubation von 5 Stunden im Brutschrank werden die Wells mit 1,5 mL RPMI Medium aufgefüllt, sodass ein Endvolumen von 2 mL vorhanden ist. Nach 48 Stunden werden die Zellen geerntet und mit PBS Puffer gewaschen und in 1 mL PBS-Puffer aufgenommen. Jeweils 200 μL der Probe werden auf 4 Wells einer weißen 96-Well-Platte verteilt und im Safire2TM Tecan Gerät vermessen. Die Messung findet bei einer Bandweite von 12 nm, einer Emissionswellenlänge von 485-515 nm und 10 *Reads* mit einer Integrationszeit von 40 μs statt. Die Auswertung erfolgt anschließend in Excel. Die Normalisierung der Werte wird mit der Grundfluoreszenz der Mock Proben durchgeführt, welche unter den gleichen Zentrifugations- und Mediumbedingungen behandelt wurden.

2.2.1.5. DUAL-LUCIFERASE ASSAY

Der Dual-Luciferase Assay ermöglicht eine Analyse der Translationseffizienz eines Reporters. Dies ermöglicht die Untersuchung der Abhängigkeit oder Regulation durch eine 5'-UTR, eines Promotors, des gesamten kodierenden Bereiches oder der 3'-UTR zu untersuchen. Letzteres wurde in dieser Arbeit analysiert, indem die 3'-UTR von *PIMI* dem Reportergens nachgeschaltet wurde. Beim Dual-Luciferase-Assay werden zwei unterschiedliche Luciferasen verwendet. Dabei handelt es sich zum einen um die synthetische Renilla Luciferase (hRluc), welche als primärer Reporter die Translationsabhängigkeit durch die 3'-UTR wiedergibt, und zum anderen die Firefly Luciferase, welche als Transfektionskontrolle dient.

Das psiCHECKTM-2 Plasmid, welches beide Reporter sowie die 3'-UTR von *PIMI* enthält, wird zunächst zusammen mit dem jeweilig zu untersuchenden Antisense-Oligonukleotid mit Hilfe von Lipofectamine 3000 transfiziert. Dafür wird pro Well einer 24-Well-Platte eine Plasmidmenge von 0,5 μg pro Well, 200-400 nM des jeweiligen

Oligonukleotids und 1,5 µl Lipofectamine verwendet. Dies wird zu $7 \cdot 10^4$ HeLa-Zellen gegeben und für ca. 56 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird zur Messung der Luciferaseaktivität das Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega verwendet. Die Durchführung erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers, was eine Zelllyse durch den im Assay enthaltenen Lysepuffer mit einschließt. Vor der Messung im Safire2™ Tecan Gerät werden die Lysate von der 24-Well Zellkulturplatte auf eine weiße 96-Well-Platte überführt und über Nacht bei -80 °C eingefroren, was die Zelllyse weiter unterstützt. Die Messung am Folgetag findet bei RT statt und die Auswertung der Lumineszenz-Werte erfolgt in Excel.

2.2.2. NUKLEINSÄURE METHODEN

2.2.2.1. GELELEKTROPHORESE

Durch die negative Ladung des Phosphatrückgrats von DNA und RNA ist es möglich, diese in einem elektrischen Feld nach ihrer Länge aufzutrennen. Die Auftrennung findet innerhalb einer Gelmatrix statt, die je nach Zusammensetzung ein kleineres oder größeres Gitternetz aufweist und so an die Art und Größe der jeweilig aufzutrennenden Nukleinsäuren angepasst werden kann.

2.2.2.1.1. AGAROSE GELELEKTROPHORESE

Agarosegele eignen sich vor allem zur Auftrennung von DNA, da die Porengröße recht groß ist. Durch den Anteil an Agarose kann der gewünschte Vernetzungsgrad des Gels angepasst werden, sodass bei kleineren DNA-Fragmenten eine Konzentration von 0,5-2 % (m/V) verwendet und bei längeren DNA-Molekülen die Konzentration bis auf 4 % erhöht wird. Dafür wird die entsprechende Menge an Agarose mit 1x TBE-Puffer vermischt und mehrmals bis zum Sieden erhitzt. Wenn die Agarose vollständig im Puffer gelöst und das flüssige Gel etwas abgekühlt ist, werden 0,1 µL/mL *GelRed*® hinzugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit der Nukleinsäure und wird für die spätere

Detektion unter Ultraviolettstrahlung (UV-Licht) benötigt. Anschließend wird das noch flüssige Gel in eine Plexiglas-Vorrichtung gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, werden mit Ladepuffer versetzte Proben in die Geltaschen aufgetragen und bei ca. 120 mA in 1x TBE-Puffer aufgetrennt. Die Auswertung findet unter UV-Licht in der ChemiDoc-Apparatur statt.

2.2.2.1.2. POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE

Im Vergleich zu Agarosegelen weisen Polyacrylamid (PAA) Gele kleinere Porengrößen auf und werden vor allem für kurze Nukleotide und RNA verwendet. Die PAA Gelelektrophorese kann entweder nativ oder durch Zufügen von Harnstoff denaturierend durchgeführt werden. Wie bei den Agarosegelen kann hier der Vernetzungsgrad individuell eingestellt werden, indem der Anteil von Acrylamid und Bisacrylamid geändert wird. Damit die Polymerisation der beiden Bestandteile beginnt, wird Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugesetzt (Zusammensetzung Tabelle 2).

Die Auspolymerisierung findet zwischen zwei Glasplatten statt, die durch zwei Plastikstreifen getrennt sind. Der anschließende Gellauf findet in 1x TBE Puffer bei ca. 20 bis 30 mA statt und die aufzutragenden Proben werden vorher 1:1 mit Probenpuffer gemischt. Zur Detektion werden die Gele anschließend für 10 bis 15 min in einer GelRed® Lösung inkubiert und unter UV-Licht ausgewertet oder im Fall von radioaktiv markierten Nukleinsäuren auf eine *Phosphorimager*-Platte gelegt.

Tabelle 13: Zusammensetzung PAA-Lösung

	20 % denaturierende PAA-Lösung	20 % native PAA-Lösung	Harnstoff 8M
Acrylamid/Bisacrylamid (24:1) 50 %	400 mL	400 mL	
10x TBE Puffer	100 mL	100 mL	100 mL
Harnstoff	480 g		480 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL	ad 1000 mL	ad 1000 mL

2.2.2.2. DNA AUFREINIGUNG

Es werden verschiedene Methoden genutzt, um DNA Moleküle bestimmter Länge von anderen zu trennen oder Reagenz-Bestandteile auszutauschen. Dabei kann die Auftrennung verschiedener DNA-Moleküle über ein Agarosegel genutzt werden, oder die Bindungseigenschaften von DNA an eine Silikamembran bei der Säulenaufreinigung.

2.2.2.2.1. GEL-AUFREINIGUNG

Um bestimmte DNA Moleküle von anderen zu trennen, wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Danach können mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs *GelRed*® unter UV-Licht die verschiedenen aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden. Die gewünschte DNA wird mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und nach Herstelleranweisung mit dem *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up* System oder dem *Monarch*® DNA Gel *Extraction* Kit aufgereinigt.

2.2.2.2.2. SÄULCHEN-AUFREINIGUNG

Wenn keine Aufreinigung bestimmter DNA-Moleküle vonnöten ist, wird direkt nach einer PCR-Reaktion (s. 2.2.2.5.1 PCR) das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up* Kit verwendet. Hierbei werden nicht eingebaute Nukleotide, Enzyme und Puffer-Bestandteile vom DNA-Produkt getrennt, indem die DNA an die Silikamembran im Aufreinigungssäulchen bindet und alle anderen Bestandteile durchgewaschen werden.

2.2.2.2.3. PLASMID PRÄPARATION

Zur Präparation von Plasmid-DNA, werden zuerst *E. coli* DH5 α Zellen mittels Hitzeschock mit dem jeweiligen Plasmid transformiert (s. 2.2.2.5.7. Transformation) und über Nacht auf einer Agar-Platte wachsen gelassen.

Von 5 mL oder 300 mL Übernachtskultur (LB Medium mit 100 μ g/mL Ampicillin) einer transformierten *E. coli* Kolonie wird anschließend die Plasmid-DNA mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kit oder des Maxi Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die in ddH₂O eluierte Plasmid-DNA wird dann bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.2.2.2.4. PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion werden Proteinen und Nukleinsäuren mittels Phasentrennung voneinander isoliert. Hierfür wird die jeweilige Probe mit dem gleichen Volumen Phenol gemischt und für 3 min gevortext und für 4 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Bei der DNA Aufreinigung wird Roti®-Phenol mit einem pH 7,5-8,0 verwendet. Für die Aufreinigung von RNA, bei welcher Proteine wie auch DNA-Verunreinigungen entfernt werden müssen, nutzt man Roti®-Aqua-Phenol mit dem pH Wert 4,5-5.

Nach dem Zentrifugationsschritt wird die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In dieser befindet sich die jeweilige Nukleinsäure. Die untere organische Phase, welche denaturierte Proteine und Lipide enthält, wird verworfen. Um das restliche Phenol zu entfernen, folgt ein Waschschrift mit Chloroform. Hierbei wird zur Probe das gleiche Volumen Chloroform hinzugegeben und für 1 min gevortext. Anschließend wird für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und wiederum die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe von Ethanol gefällt.

2.2.2.2.5. ETHANOL-FÄLLUNG

Vor der Fällung wird zur jeweiligen Probe 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.0 und 2.5-faches Volumen 96 % Ethanol hinzugefügt. Dies wird nach kurzem Mischen für mindestens eine Stunde bei – 20 °C gelagert. Anschließend wird die Probe für 45 min bei 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Nukleinsäure Pellet wird nach dem Entfernen des Überstandes bei RT getrocknet, bis das restliche Ethanol verdampft ist. Danach wird das Pellet in der entsprechenden Menge an dH_2O resuspendiert und weiterverwendet.

2.2.2.3. RNA SÄULCHEN-AUFREINIGUNG

Bei der RNA Aufreinigung aus eukaryotischen Zellen wird das miRNA NucleoSpin® Kit zur Isolation verwendet. Die Zellyse findet nach Herstellerangaben mit dem ML Puffer statt und kann anschließend nach dem Einfrieren mit flüssigen Stickstoff über mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden. Das miRNA NucleoSpin® Kit ermöglicht es, alle RNAs zusammen oder kleine (<200 nt) und größere (>200 nt) RNA-Moleküle getrennt voneinander aufzureinigen. Bei der Untersuchung von miRNA-Expressionen werden in dieser Arbeit nur kleine RNAs aufgereinigt, wobei bei den Analysen der *PIMI* mRNA alle Fraktionen zusammen aufgereinigt werden.

2.2.2.4. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Um die Konzentration von DNA und RNA bestimmen zu können, werden 2 µL einer Probe auf die Messvorrichtung des UV Spektrometers pipettiert. Dieses misst im Anschluss die Absorption der Probe über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 1100 nm. Mit Hilfe des so erhaltenen Absorptionsspektrums können die Konzentration sowie der Reinheitsgrad der Probe bestimmt werden.

Bei der Aussage über die Qualität der Probe ist das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) zueinander entscheidend, welches eine Aussage über die Verunreinigung durch Proteine angibt. Des Weiteren gibt das Verhältnis der Absorption bei 230 nm und 260 nm an, ob eine Verunreinigung durch Salze, Zucker oder andere Chemikalien vorliegt. Bei einer reinen extrahierten Nukleinsäure sollte das Verhältnis von 260 nm zu 280 nm zwischen 1,8 und 2 liegen und von 230 nm zu 260 nm >2.

Die Formel zur Berechnung der DNA- oder RNA-Konzentration leitet sich vom Lambert-Beerschen Gesetz ab.

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Korrekturfaktor}$$

Der Korrekturfaktor von doppelsträngiger DNA ist 50 bzw. 40 bei einzelsträngiger RNA.

2.2.2.5. KLONIERUNG

Für die Herstellung des RNA-Substrats 155 für die Spalter-Assays (s. Spaltkinetiken) wird zuerst die gewünschte 5'-UTR Sequenz der *PIM1* mRNA in einen geeigneten Vektor kloniert. Hierfür wird der Vektor Puc19 und dessen Schnittstellen *EcoRI* und *KpnI* verwendet. Die Sequenz der Primer, über welche die PIM1 Sequenz sowie der T7 Promoter eingebracht werden, ist im Materialteil aufgeführt. Nach diesem ersten Klonierungsschritt wird in einem zweiten *Site-directed-mutagenesis* Schritt ein Sequenzabschnitt von 314 Nukleotiden deletiert und dafür ein Loop von 4 Nukleotiden eingefügt.

2.2.2.5.1. PCR

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) dient zur Vervielfältigung von DNA Molekülen. Hierfür wird eine hitzestabile DNA-Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), ein DNA-Templat und spezifische Primer verwendet. Das für die Polymerase nötige $MgCl_2$, sowie die dNTPs sind hierbei im Mastermix schon enthalten.

Die Reaktion findet in drei Hauptschritten statt. Zuerst wird der DNA-Doppelstrang bei 98 °C denaturiert. Dadurch können sich anschließend die Primer während der Annealing-Phase anlagern. Hierbei richtet sich die Temperatur an den Schmelzpunkt der Primer, wobei diese ein wenig unterhalb liegen sollte. Nach der Anlagerung der Primer kann die DNA-Polymerase an die DNA-Einzelstränge binden und diese in der Elongations-Phase verlängern. Diese drei Phasen werden 25 bis 30 x wiederholt, bis die Reaktion schließlich terminiert wird (s. Tabelle 14).

Der Reaktionsansatz (s. Tabelle 13) wird in Mikroreaktionsgefäße pipettiert, welche vor der Reaktion noch kurz zentrifugiert und dann in den Thermocycler überführt werden. Im Anschluss können die entstandenen PCR-Produkte auf einem Agarosegel analysiert werden.

Tabelle 14: Zusammensetzung eines PCR Ansatzes

Substanzen	Volumen
2x Phusion Master Mix	10 µL
Primer <i>foward</i> (10 µM)	1 µL
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1 µL
Templat	10 ng/ µL
ddH ₂ O	ad 20 µL

Tabelle 15: Thermocycler-Einstellung für das PCR Programm

Zyklusphase	Temperatur	Zeit	
Initialisierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	
<i>Annealing</i>	x °C	20 s	25-30
Elongation	72 °C	30 s / kb	Zyklen
Termination	72 °C	10 min	
Lagerung	4 °C	∞	

2.2.2.5.2. RESTRIKTIONSVERDAU UND DEPHOSPHORYLIERUNG

Der Restriktionsverdau ist eine Methode zur spezifischen Spaltung von DNA-Molekülen und wird innerhalb der Klonierung zur Linearisierung eines Plasmides oder zum Hinzufügen und Entfernen von bestimmten Bereichen verwendet. Bakterielle Restriktionsendonukleasen können fremde DNA erkennen und schneiden diese spezifisch nach oder vor ihrer jeweiligen 4-6 Nukleotid langen Erkennungssequenz. Bei der Spaltung der Phosphodiesterbindungen kann es entweder zu einer symmetrischen Spaltung beider DNA-Stränge kommen (*blunt ends*) oder zu einer versetzten, bei welcher 5'- oder 3'- überhängende Enden entstehen (*sticky ends*). In dieser Arbeit werden ausschließlich *FastDigest* Restriktionsenzyme verwendet, welche alle im gleichen Universalpuffer aktiv sind. So kann der DNA-Verdau parallel mit zwei verschiedenen Enzymen durchgeführt werden

Die Thermosensitive Alkaline-Phosphatase (FastAP) katalysiert die Freisetzung von 5'- und 3'-Phosphatgruppen von DNA. Hierdurch wird verhindert, dass das geschnittene Plasmid vor der Ligation wieder religieren kann. Da dieses Enzym im gleichen Universalpuffer aktiv ist wie die Restriktionsenzyme, kann dieser Schritt zusammen mit dem Verdau durchgeführt werden. Der 20-30 µL Ansatz (s. Tabelle 16) wird für 20 min bei 37 °C inkubiert und zur Inaktivierung der Enzyme nochmals für 5 min bei 80 °C. Im Anschluss folgt eine Kontrolle des Verdaus über Agarose-Gelelektrophorese mit gegebenenfalls nachfolgender Gelaufreinigung.

Tabelle 16: Reaktionsansatz Restriktionsverdau

Substanzen	Plasmid-Verdau	Insert-Verdau
DNA	bis 1 µg	0,07 - 0,2 µg
10x <i>FastDigest</i> Puffer	2 µL	3 µL
<i>FastDigest</i> Enzym A	1 µL	1 µL
<i>FastDigest</i> Enzym B	1 µL	1 µL
FastAP	1 µL	-
ddH ₂ O	ad 20 µL	ad 30 µL

2.2.2.5.3. SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

Bei der *site-directed Mutagenesis* können gezielt Mutationen mit Hilfe von speziell konstruierten Primern in bereits vorhandenen Plasmide eingebracht werden. Dabei tragen die Primer die gewünschte Mutation schon in ihrer Sequenz, oder es wird über die Positionierung der Primer eine Deletion oder Insertion eines bestimmten Abschnitts durchgeführt. Hierbei wird das komplette Plasmid in der PCR-Reaktion amplifiziert. Im Fall einer Deletion werden die jeweiligen Primer so gesetzt, dass eine Lücke zwischen diesen Beiden entsteht. Dieser Bereich wird während der PCR nicht amplifiziert und folglich aus dem Plasmid deletiert. Bei einer Insertion wird einer der beiden Primer mit der gewünschten Sequenz verlängert und bei einer Substitution von Nukleotiden, besitzt einer der beiden Primer die veränderte Mutation, die eingebracht werden soll. Das nach der PCR mit den *site-directed Mutagenesis* entstandene, veränderte Plasmid wird zuerst mit dem Enzym *DpnI* verdaut, phosphoryliert und anschließend wieder ligiert.

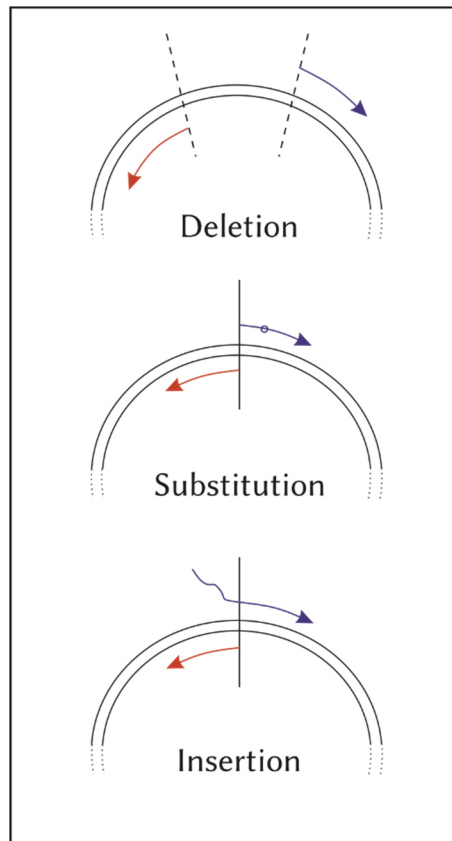


Abbildung 6: Site-directed Mutagenesis

Schematische Darstellung des Prinzips. Primerwahl zur Deletion eines Bereichs; Primer mit Punktmutation bei einer Substitution; Verlängerter Primer für eine kurze Insertion

2.2.2.5.4. DPN I VERDAU

Um nicht-mutierte Templat-DNA vom PCR Produkt zu trennen, wird die Endonuklease DpnI verwendet. Die Templat-DNA liegt in methylierter Form vor, was nicht auf die PCR-Produkte zutrifft. Da das Enzym *DpnI* nur methylierte oder hemimethylierte DNA abbaut, können so beide voneinander getrennt werden. Der Enzym Verdau findet nach Herstellerangaben im Anschluss an die PCR-Reaktion statt.

2.2.2.5.5. PHOSPHORYLIERUNG

Nach der *Site-directed Mutagenesis* findet eine *Blunt-end* Ligation statt. Damit diese durchgeführt werden kann, muss zuerst das 5'-Ende des PCR Produktes phosphoryliert werden. Dafür wird die T4-Polynukleotid-Kinase nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.5.6. LIGATION

Bei einer Ligation findet eine enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA-Fragmente statt. Dabei wird mit Hilfe der T4 Ligase das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der DNA unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Der Reaktionsansatz wird nach Herstellerangaben zusammengesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend findet die Transformation in Bakterien statt. Die Menge an eingesetztem PCR Produkt wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Insert (ng)} = \frac{250 \text{ ng Vektor} \cdot \text{Basenpaar-Anzahl Insert}}{\text{Basenpaar-Anzahl Vektor}}$$

2.2.2.5.7. TRANSFORMATION

Für die Hitzeschock Transformation werden *E.coli* DH5 α Bakterien verwendet. Diese werden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend werden 50 μ L der Bakteriensuspension mit 8 μ L Ligations-Ansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgt ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C. Nach einem weiteren 5-minütigen Inkubationsschritt auf Eis wird 1 mL vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und die Bakteriensuspension bei 37°C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss werden die Bakterien kurz zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 μ L abgenommen. Das entstandene Pellet wird im restlichen Medium wieder gelöst und zur Selektion auf eine LB-Agar-Platte (mit 100 μ g/mL Ampicillin) ausplattiert. Diese wird über Nacht bei 37 °C inkubiert und am Folgetag auf gewachsenen Bakterien-Kolonien untersucht.

2.2.2.5.8. KOLONIE-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR kann untersucht werden ob ein erfolgreich kloniertes Plasmid in Bakterien transformiert worden ist. Hierfür werden die transformierten Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze von der LB-Agar-Platte gepickt und kurz in 50 μL ddH_2O getaucht. Um mit den jeweiligen Kolonien später weiter arbeiten zu können, werden anschließend dieselben Pipettenspitzen zum Ausstreichen auf einer neuen LB-Agar-Platte (mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin) genutzt.

Die 50 μL Bakteriensuspensionen werden dann für 5 min bei 95 °C erhitzt und 14 μL der Ansätze als Templat für die folgende PCR weiterverwendet. Zum Templat werden 4 μL des *Cytopol Hot Blend Mastermix* (12 mM MgCl_2) pipettiert und 10 pmol des jeweiligen Primers. Bei der Kolonie-PCR werden Primer verwendet, die auf dem klonierten Insert binden können sowie in entgegengesetzte Richtung auf dem Plasmid-*Backbone* binden. Das Schema der Kolonie-PCR ist in Tabelle 3 dargestellt. Die amplifizierte PCR-Produkte werden anschließend mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet.

Tabelle 17: Kolonie PCR Schema

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	15 min	1
95 °C	15 sec	30
59 °C	20 sec	
72 °C	20 sec	
72 °C	1 min	1
4 °C	∞	

2.2.2.5.9. GLYCERIN AUFBEWAHRUNG

Um transformierte Bakterienzellen langfristig lagern zu können, werden diese mit Glycerin versetzt. Dabei werden 500 μL einer *E. coli* DH5 α Übernachtskultur mit 500 μL Glycerin in Kryoröhrchen gemischt und zügig bei -80 °C eingefroren und gelagert. Von

diesen Glycerin-Stocks können bei Bedarf kleine Mengen in flüssiges LB-Medium überführt werden, um wieder größere Mengen an Bakteriensuspension herzustellen.

2.2.2.5.10. SEQUENZIERUNG

Für die Sequenzierung wird ein Ansatz von 12 μL vorbereitet mit einer Konzentration von 100 ng/ μL der zuvor aufgereinigten DNA Probe. Es werden entweder 3 μL einer 10 μM Primerlösung hinzugegeben oder ein Standardprimer ausgewählt, der von der Sequenzierfirma Seqlab hinzugefügt wird. Auf der Website von Seqlab werden die Proben einer Etikett-Nummer zugeordnet und anschließend mit dieser markiert. Nach Absenden der Probe, können die sequenzierte Sequenzen online eingesehen und im Programm Snapgene weiter analysiert werden.

2.2.3. RNA METHODEN

2.2.3.1. *IN- VITRO* TRANSKRIPTION

Für die Herstellung spezifischer RNA-Substrate wird die T7-RNA-Polymerase verwendet. Hierfür wird ein linearisiertes DNA-Templat, Ribonukleoside und weitere für die Transkription benötigte Reagenzien in einem 1000 μL Ansatz pipettiert (s. Tab. 18). Dieser Reaktionsansatz wird in fünf je 200 μL Ansätze aufgeteilt zu jedem 5 μL T7-RNA-Polymerase hinzugegeben um die Transkription zu starten. Die Proben werden daraufhin für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Hinzugeben von 3 μL T7-RNA-Polymerase wird die Inkubation nochmals für 2 Stunden durchgeführt. Um die Polymerase und weitere Bestandteile von der synthetisierten RNA zu trennen, folgt eine Phenol-Chloroform Aufreinigung, wobei hier anstatt einer Ethanol Fällung eine weitere Aufreinigung mittels PAA-Gel durchgeführt wird. Nach dem Gellauf wird das Gel in Kunststoffolie eingepackt und die gewünschte Bande mit Hilfe von UV-Licht lokalisiert und markiert. Mit Hilfe eines Skalpells wird die gewünschte Bande ausgeschnitten und

in kleinere ca. 1 cm lange Stücke geschnitten. Diese werden in ein 15 mL Röhrchen überführt und mit 1 M NaAc pH 5 aufgefüllt sodass alle Gelstücke bedeckt sind. Die Gelelution findet dann bei 4 °C schüttelnd über Nacht statt. Am Folgetag wird der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und über einer Nylonsäule von restlichen Gelresten getrennt. Im Anschluss wird eine Ethanol-Fällung durchgeführt und das RNA-Pellet in entsprechendem Volumen ddH_2O gelöst.

Tabelle 18: Reaktionsansatz T7-Transkription

Substanzen	Endkonzentration	Volumen
1 M HEPES, pH 7,5	80 mM	80 μL
23 mM rNTPs	4 mM (Jedes)	160 μL
3 M MgCl_2	20 mM	66 μL
100 mM DTT	10 mM	100 μL
100 mM Spermidin	1 mM	10 μL
DMSO	5 %	50 μL
DNA Templat	70 μg	30 μL
200 U/ml Pyrophosphatase	1 U/mL	5 μL
ddH_2O	Ad 1000 μL	474 μL

Im Fall eines PCR-Produktes als Templat für die *in vitro* Transkription, wird das *HiScribeT7 High Yield* RNA Synthese Kit von NEB nach Herstellerangaben verwendet. Die anschließende Aufreinigung findet wie oben beschrieben statt.

2.2.3.2. DEPHOSPHOLYIERUNG

Das jeweilige RNA-Substrat muss vor der radioaktiven Markierung zuerst dephosphoryliert werden, wofür die Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP) verwendet wird. Hierbei werden ca. 15 μg RNA mit 1 U der FastAP und 1x FastAP Puffer in einem 10 μL Ansatz für 25 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Enzym bei einer Inkubation von 5 min bei 75 °C inaktiviert. Die dephosphorylierte RNA ist nicht

sehr stabil und sollte zeitnah für die radioaktive Endmarkierung weiterverwendet werden. Eine kurze Lagerung bei -80 °C ist möglich.

2.2.3.3. RADIOAKTIVE 5'-ENDMARKIERUNG

Um kleinste Mengen an RNA detektieren zu können, wird diese an ihrem 5'-Ende radioaktiv markiert. Hierfür wird das zuvor mittels T7-Transkription hergestellte RNA-Substrat am dephosphorylierten 5'-OH mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase und γ^{32} -P-ATP phosphoryliert.

Der Reaktionsansatz (s. Tab. 19) wird 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem entsprechend gleichen Volumen an 2x RNA Probenpuffer versetzt. Daraufhin wird die markierte Probe auf einem 8% PAA-Gel aufgetrennt. Die gewünschte Bande wird nach dem Gellauf ausgeschnitten und über Nacht bei 8 °C in 1 M Natriumacetat pH 5 schüttelnd eluiert. Das Eluat wird danach zuerst filtriert und mit Hilfe von Ethanol gefällt und in 10 μ L ddH₂O gelöst. Die Aktivität der radioaktiv markierten RNA wird mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

Bei längeren RNA-Molekülen ist das Eluieren aus einem PAA Gel sehr ineffizient. Hierbei wird der Schritt der Gelaufreinigung übersprungen und stattdessen eine Aufreinigung über eine Illustra MicrospinTM G-25 Säule durchgeführt. Alle restlichen Schritte werden wie weiter oben beschrieben durchgeführt.

Tabelle 19: Reaktionsansatz Radioaktive 5'-Endmarkierung

Reagenzien	Volumen
Dephosphorylierte RNA	60 pmol
10x T4 PNK Puffer A	1,5 μ L
T4 PNK 10 U/ μ L	1 μ L
γ^{32} -P-ATP	2 μ L
ddH ₂ O	ad 15 μ L

2.2.3.4. REVERSE TRANSKRIPTION

Für die Bestimmung der relativen RNA-Konzentration wird zuerst die RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wird zuerst ein 13 µL Ansatz aus 1 µg RNA, 0,5 µL 10 µM Primer und ddH₂O hergestellt, welcher für 5 min bei 65 °C in einem PCR-Gerät inkubiert wird. Anschließend folgt ein 5-minütiger Inkubationsschritt auf Eis und danach wird zu jedem Ansatz 7 µL eines Mastermixes hinzugegeben. In diesem sind Reaktionspuffer, Desoxynukleotide (dNTP) und die Reverse Transkriptase enthalten (s. Tab. 20). Für die –RT Kontrolle wird die Transkriptase durch ddH₂O ersetzt. Die Proben werden dann im PCR-Gerät für 60 min bei 42 °C und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Alle Pipettierschritte werden auf Eis durchgeführt.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Substanzen	Volumen
RNA	1 µg
10 µM Primer	0,5 µL
ddH ₂ O	ad 13 µL
5 min 65 °C	
5x Reaktion Puffer	4 µL
10 mM dNTPs	2 µL
Reverse Transkriptase (<i>Revert aid H minus RT</i>)	1 µL

2.2.3.5. RT-QPCR

Für die Bestimmung der relativen RNA-Konzentration wird die quantitative *Realtime*-PCR (qPCR) durchgeführt, die zusammen mit dem vorangegangenen Reverse Transkriptions Schritt als RT-qPCR bezeichnet wird. Hiefür wird die zuvor hergestellte cDNA 1:2 mit ddH₂O verdünnt. Für jede cDNA Probe wird ein Mastermix hergestellt, welcher aus 1 µL Primerset (fwd. und rev. jeweils 2 µM), 10 µl Absolute QPCR Capillary Mix 2x, SYBR Green und 4 µl ddH₂O besteht. In ein Well einer MicroAmpTM Fast Optical

96-Well Platte werden zuerst 15 μL des Mastermix vorgelegt und anschließend mit 5 μL der cDNA ergänzt. Dies wird pro Ansatzmenge hochskaliert für die jeweilige Anzahl an Proben. Danach wird die 96-Well-Platte mit einer selbstklebenden MicroAmpTM Folie verschlossen und kurz anzentrifugiert. Die Proben-Platte wird im Anschluss im MyiQTM5 *Real-Time PCR Detection System* unter folgenden Bedingungen analysiert.

Tabelle 21: Reaktionsbedingungen der qPCR Analyse

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Amplifikation	95 °C	10 sek	55
	55 °C	10 sek	
	72 °C	10 sek	
Schmelzkurve	65 °C → 95 °C	15 sek	1 °C pro sek
Abkühlen	40 °C	30 sek	-

Die Auswertung erfolgt anschließend nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak & Schmittgen, 2001)

2.2.3.6. SPALTKINETIKEN

Vor der Spaltung wird die 5'-[³²P]-endmarkierte RNA zuerst zurückgefaltet. Hierfür wird diese in 50 mM Tris Puffer (pH 8.0) verdünnt und anschließend bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (3 min bei 95 °C, 2 min bei 85 °C, 2 min bei 75 °C, 2 min bei 65 °C, 2 min bei 55 °C und 3 min bei 37 °C). Im Anschluss werden ca. 24 nM der zurückgefalteten 5'-[³²P]-RNA mit der jeweiligen Konzentration des Konjugat 12 (2-300 nM; 12,5 μM wenn für *Primer Extension*) bei 37 °C in einem Komplettvolumen von 20 μL 50 mM Tris Puffer (pH 8.0) inkubiert. Zur Analyse werden nach 1, 4, 16 und 20 Stunden jeweils 5 μL entnommen und mit 5 μL 2x RNA Probepuffer gemischt. Die Spaltprodukte werden anschließend auf einem 10 % oder 7 % PAA Gel aufgetrennt und mit dem *Phosphorimager* visualisiert. Die anschließende Auswertung wird mit dem Programm *GraFit* durchgeführt.

2.2.3.7. PRIMER EXTENSION

Um die Basensequenz des 5'-Endes einer RNA bestimmen zu können, wird zuerst ein radioaktiv markierter Primer an die zu untersuchende RNA angelagert.

Hierfür werden 2 µg der RNA mit 1 µL des 5'-endmarkierten Primers (4000 cpm) nach dem SuperScript™ III Reverse Transkriptase Herstellerprotokolls (Thermo Fisher Scientific) für 5 min bei 65 °C inkubiert und danach für 1 min auf Eis gelagert.

Die anschließende Reverse Transkription findet bei 55 °C für 50 min statt. Um die Reaktion zu beenden werden 20 µL 2x RNA Probenpuffer hinzugegeben und auf einem 20 % denaturierten PAA Gel aufgetrennt und analysiert (Zellmann et al., 2019).

2.2.4. PROTEIN-METHODEN

2.2.4.1. ZELLYSE

Vor der Zelllyse werden die Zellen zuerst mit 1x PBS Puffer gewaschen und anschließend bei 8000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet für mehrere Stunden oder über Nacht bei -80 °C eingefroren. Nach dem langsamen Auftauen auf Eis wird das Pellet in 25-40 µL RIPA Puffer mit zugegebenem Protease Inhibitor Cocktail gelöst und für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wird das Lysat alle 5 min kurz gevortext. Um unerwünschte Zell- und Membranreste zu beseitigen, folgt ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C weggefroren oder zur SDS Page Analyse weiterverwendet. Vor dem Gellauf werden die Proben 1:1 mit Probenpuffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 1,4 M 2-Mercaptoethanol, 0,05 % Bromophenolblau) gemischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt.

2.2.4.2. SDS PAGE

Um die im Zell-Lysat enthaltenen Proteine ihrer Größe nach auftrennen zu können, wird die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) Methode verwendet. Für die Analyse des PIM1 Proteins werden 12 % SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet (Zusammensetzung s. Tab.7). Zuerst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen, welche in einer Gießapparatur befestigt sind. Dabei wird zum Taschenkamm etwa noch 1 cm Platz gelassen. Um ein gerades Abschließen des Trenngels zu gewährleisten, wird dieses im flüssigen Zustand mit Isopropylalkohol überschichtet und dann auspolymerisiert. Danach wird der Isopropylalkohol abgeschüttet, das Sammelgel wird über das Trenngel gegossen und der Taschenkamm eingesetzt. Sobald das Gel komplett auspolymerisiert ist, wird der Kamm entfernt und mit den jeweiligen Proben beladen. Die Gelelektrophorese findet in einer Gelkammer, gefüllt mit 1x SDS Laufpuffer, bei zunächst 80 V statt. Sobald die Proben in das Trenngel eingelaufen sind, wird die Spannung auf 160 V erhöht.

Tabelle 22: Zusammensetzung 12 % SDS-Gel

Substanz	Trenngel	Sammelgel
4x Sammelgel-Puffer (0,6 % SDS, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8)		0,45 mL
4x Trenngel-Puffer (0,6 % SS, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8)	1 mL	
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	1,6 mL	0,25 mL
APS (10 % Lösung)	10 µL	12 µL
Temed	5 µL	4,5 µL
ddH ₂ O	1,375 mL	1,175 mL

2.2.4.3. WESTERN BLOT

Mit Hilfe der Western Blot (WB) Methode ist es möglich, Proteine von einem Gel auf eine Trägermembran zu übertragen. Anschließend können diese spezifisch durch Antikörper nachgewiesen werden.

Das 12 % SDS-Gel und 2 Whatman-Papiere gleicher Größe werden kurz in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glycin, 10% Methanol) inkubiert. Eine entsprechend große PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran wird für ca. 15 Sekunden in Methanol geschwenkt und im Anschluss kurz in ddH_2O gewaschen. Danach wird die Membran ebenfalls in Transferpuffer für kurze Zeit inkubiert. Auf der Blotting-Apparatur werden dann SDS-Gel, Whatmanpapiere und die PVDF Membran nach dem folgenden Schema übereinander geschichtet:

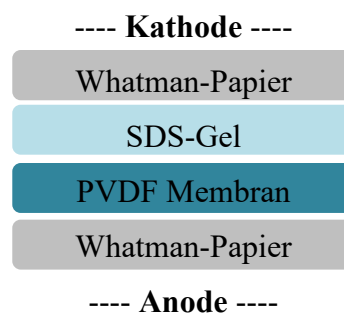


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Western Blots während der Proteinübertragung in der Blotting-Apparatur

In der Blotting-Apparatur werden die Proteine für 33 min bei 10 V auf die Membran geblottet. Diese wird im Anschluss für 2 h bei RT in 5 % Milchpulverlösung (5 % (m/V) Milchpulver in TBST-Puffer) inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wird mit TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) gewaschen und anschließend in 4 mL Primär-Antikörper Lösung über Nacht bei 4 °C drehend inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde dafür in 5 % BSA Lösung (5 % (m/V) BSA in TBST-Puffer) zuvor verdünnt.

Für die Sekundär-Antikörper Inkubation wird die Membran drei Mal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und für 1 h bei RT in 4 mL Sekundär-Antikörper Lösung inkubiert. Bei dieser Lösung wird der Antikörper in 5 % Milchpulver Lösung verdünnt.

Vor der Detektion wird die Membran nochmals drei Mal für 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Bei K56- Zellen wird der α PIM1 Antikörper 1:1000 und der Zweitantikörper α Rabbit 1:3000 verdünnt. Die gleiche Verdünnung wird bei der Detektion des humanen Argonaute2 Proteins durchgeführt. Dies ändert sich bei HeLa-Zellen bei α PIM1 auf 1:850 und α Rabbit auf 1:2500.

2.2.4.4. CHEMOLUMINESZENZ DETEKTION

Röntgenfilm

Bei einigen in dieser Arbeit gezeigten WBs konnte kein ChemiDoc Gerät zur Detektion verwendet werden. In diesem Fall wird die Detektion in einer Dunkelkammer bei Rotlicht durchgeführt. Dabei wird das ECL-Reagenz Western Lightning Plus-ECL entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Anschließend wird auf die benetzte Membran ein BioMaxTM Röntgenfilm in einer Röntgenkassette aufgelegt und kurz inkubiert. Danach wird der Film mittels einer Entwicklerlösung und Fixierlösung entwickelt. Zwischen dem kurzen Baden des Films in den Lösungen finden kurze Waschgänge in Wasser statt. Nach der Trocknung des Röntgenfilms kann dieser eingescannt und weiter ausgewertet werden.

ChemiDoc

Mit Hilfe des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers kann eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert werden, wodurch das zu untersuchende Protein detektiert werden kann. Hierfür wird eine 1:1 Mischung des *SignalFire*TM ECL Reagenzes auf die PVDF Membran geschichtet und für 1 min inkubiert. Anschließend findet die Detektion in der ChemiDoc Apparatur für 15 min statt.

2.2.4.5. STRIPPEN UND β -AKTIN DETEKTION

Wenn eine zweite Immundetektion mittels Antikörper durchgeführt wird, werden zuerst die gebundenen Antikörper der ersten Detektion von der Membran entfernt. Hierfür wird diese für 15 min in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2 % SDS) bei 50 °C schwenkend inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimal für je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und für 2 h bei RT in 5%iger Milchpulver-Lösung geblockt. Bei der zweiten Immundetektion handelt es sich um die Detektion des konstitutiv exprimierten β -Aktins. Hierbei werden Primär- (1:10.000) und Sekundär-Antikörper (1:5000) zusammen in 10 mL 5 % Milchpulver Lösung verdünnt und für 40 min bei RT zur Membran gegeben. Die Immundetektion erfolgt wie zuvor beschrieben, jedoch wird die Exposition auf ca. 3 min verkürzt.

2.2.4.6. QUANTIFIZIERUNG DER PROTEINEXPRESSION

Zur Quantifizierung der Proteinexpression werden die aufgenommenen Dateien der Antikörper-Detektion in der *ImageLab* Software ausgewertet. Hierbei werden alle aufgetragenen Probenbahnen und die spezifischen Proteinbanden markiert. Dies wird für die PIM1 und P21 Detektion, sowie für β -Aktin durchgeführt, wobei letzteres zur Normalisierung verwendet wird. Das Programm ImageLab gleicht die Intensitätswerte der PIM1-Banden mit denen der Kontrolle β -Aktin ab und gibt die auf die Kontrolle normalisierten Proteinkonzentrationen an. Diese werden anschließend weiter in Excel ausgewertet und zugeordnet.

2.2.4.7. PROTEIN *PULLDOWN*

Um untersuchen zu können, ob ein LNA-Biotin-Oligonukleotid von Argonaute 2 Proteinen gebunden und isolieren werden kann, wird ein *Pulldown*-Experiment

durchgeführt. Hierfür werden 1 mg Proteinlysate aus K562-Zellen mit 200 nM Biotin-LNA in Ladepuffer (0,5 x SSPE-Puffer mit 10 % Roti®-Block) rotierend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Kontrolle wird eine Probe Zelllysate ohne Biotin-LNA ebenfalls über Nacht inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern, werden ca. 70 µL der magnetischen Streptavidin-Beads zwei Mal mit Ladepuffer gewaschen und anschließend in 600 µl desselben Puffers über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag werden die Beads 3-mal mit Inkubationspuffer (100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM Tris·HCl pH 8.0 und 10 % Roti®-Block) gewaschen und jeweils 25 µl zu den Lysaten mit und ohne LNA hinzugegeben. Die Proben werden bei Raumtemperatur für 30 min rotierend inkubiert. Anschließend findet ein mehrmaliges Waschen von 7-8 Schritten mit Ladepuffer statt, welchem noch 2 mM DTT hinzugesetzt wird. Die Waschvorgänge werden in einem Eppi durchgeführt, welches an einem Magnetständer befestigt ist, sodass die magnetischen Beads während des Vorgangs nicht mit abgenommen werden können. Zu den gewaschenen Beads werden dann 15 µl Western Blot Lysepuffer hinzugegeben und diese für 20 min bei 95 °C aufgekocht. Der Überstand wird anschließend zur weiteren Analyse auf ein 10 % SDS Gel aufgetragen und ein WB gegen Argonaute-2 durchgeführt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. RISC-UMLEITUNG DURCH EIN BIFUNKTIONELLES ADAPTER-OLIGONUKLEOTID

Bei den meisten Tumorarten liegt eine Dysregulation vieler Proteine vor, die ebenfalls die Expression verschiedener miRNAs betrifft (P. S. Chen et al., 2012; Vaklavas et al., 2017). So konnte beim Tumorsuppressor P21 gezeigt werden, dass dessen Expression bei manchen Krebsarten, wie Darmkrebs, durch eine erhöhte Expression der miRNA-20a negativ reguliert wird (Sokolova et al., 2015). Im Gegensatz zu P21 ist die Expression des Proto-Onkogens PIM1 in vielen Tumorarten erhöht (Nawijn et al., 2011), was zu einer stärkeren Zellproliferation und einer Inhibition der Apoptose führen kann.

Mit dem Einsatz eines bifunktionellen DNA/LNA-Adapter-Oligonukleotids sollen diese zwei dysregulierten Faktoren, die miRNA-20a und das Proto-Onkogen PIM1, gleichzeitig adressiert und somit ein doppelter antitumorigener Effekt erreicht werden. Für diesen Ansatz wird der RNAi Mechanismus genutzt, der bei der Bindung von miRNAs an die 3'-UTR einer mRNA induziert wird, was meist zu einer Blockierung der Translation führt. Diese wird durch den Proteinkomplex RISC vermittelt, welcher unter anderem im humanen System das Protein Argonaute 2 (AGO2) beinhaltet. Dieser Proteinkomplex bindet dabei zunächst miRNA/miRNA* Duplexe und wird durch die gebundene miRNA im Anschluss zur Ziel-mRNA dirigiert. Der bifunktionale DNA/LNA-Adapter besteht aus zwei unterschiedlichen Oligonukleotid-Sequenzen, welche durch einen Polyethylenglykol-Linker verbunden sind (siehe Abb. 8 und 12). Einer der beiden Adaptersequenzen fungiert als LNA-Antimir und ist so in der Lage, indirekt RISC-Komplexe zu binden, welche mit der zur Adapter-Sequenz komplementären miRNA beladen sind. Der zweite Adapterbereich beinhaltet eine DNA/LNA Mixmer-Sequenz, welche gegen die 3'-UTR der *PIMI* mRNA gerichtet ist. Dieser zweite Adaperteil besitzt den Vorteil unabhängig von RNAi Restriktionen zu sein und ist somit frei modifizierbar. Durch diesen Aufbau kann der bifunktionelle Adapter den zuvor gebundenen RISC-Komplex anschließend zur *PIMI* mRNA umleiten. RISC-Komplexe sind nicht nur für die aktive Hydrolyse von mRNAs verantwortlich, sondern

rekrutieren auch weitere Proteine, die den Abbau und die Deadenylierung der mRNA induzieren. Es wird davon ausgegangen, dass diese Vorgänge nicht durch direkte Interaktion mit der mRNA, sondern durch Proteininteraktionen mit dem AGO-Protein hervorgerufen werden (Jonas & Izaurralde, 2015). Dies ermöglicht einen doppelten Effekt durch das Einsetzen des bifunktionellen Adapters, wobei es nach der Bindung des Adapters nicht nur zu einer Funktionsinhibition der gebundenen onkogenen miRNA kommt, sondern gleichzeitig zur Suppression der mRNA Translation.

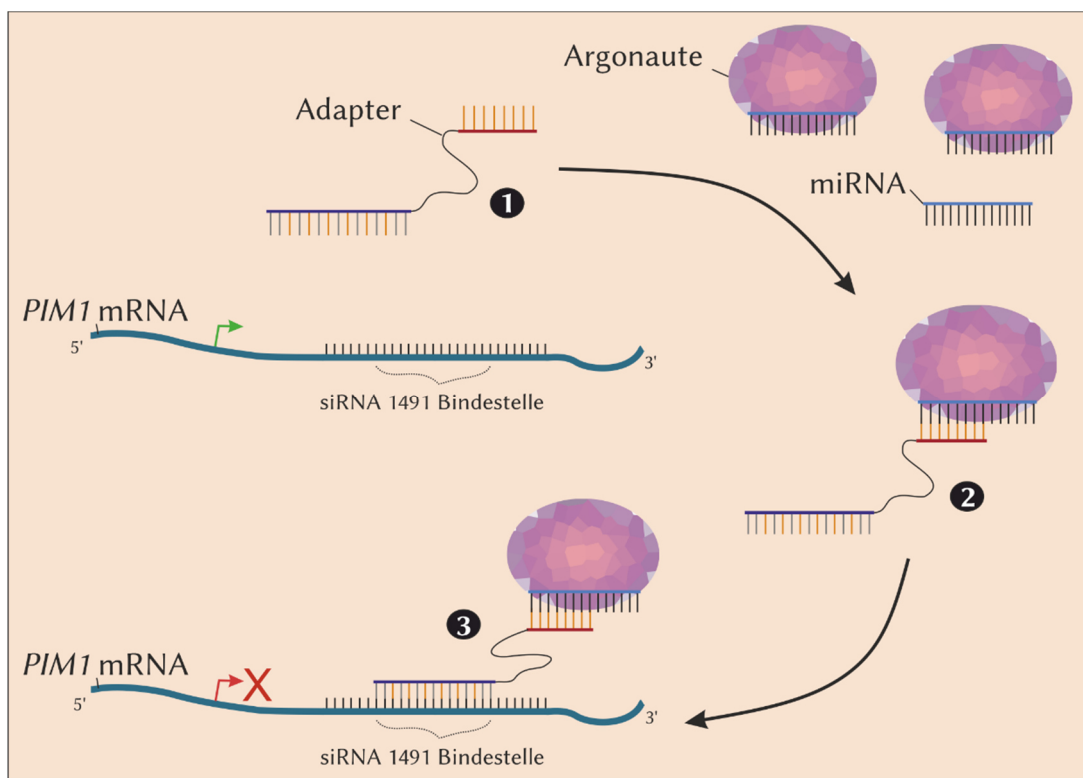


Abbildung 8: Schematische Darstellung der RISC-Umleitung durch einen bifunktionellen Adapter

Der bifunktionelle Adapter besteht aus einem LNA-Oligonukleotid, welches gegen eine miRNA gerichtet ist und einem DNA/LNA Mixmer, der an die siRNA1491 Bindestelle innerhalb der *PIM1* mRNA binden kann (1). An ein mit miRNA beladenes Argonaute-Protein bindet der LNA-Oligonukleotid Bereich des Adapters mittels Watson-Crick Basenpaarung (2). Das Mixmer Oligonukleotid bindet die mRNA und dirigiert den mit miRNA beladenen RISC-Komplex zur *PIM1* mRNA (3), wodurch die Expression des PIM1-Proteins vermindert und gleichzeitig eine potentiell onkogene miRNA an ihrer Funktion gehindert wird.

3.1.1. PULLDOWN VON HUMANEN AGO2 PROTEINEN AUS K562 ZELLYSATEN

Um diese Arbeitshypothese überprüfen zu können, wurde ein Pulldown Experiment mit K562 Zelllysaten und einem biotinylierten Antimir aus LNA-Nukleotiden durchgeführt. Hierbei soll getestet werden, ob es möglich ist mit miR-20a beladene humane Argonaute 2 (hAGO2) Proteine zu binden, was essentiell für eine erfolgreiche RISC-Umleitung zur gewünschten mRNA ist. Die Zelllysate wurden über Nacht mit und ohne biotinyliertes LNA-Oligonukleotid inkubiert. Am Folgetag wurden magnetische Streptavidin-Beads hinzugegeben und nach mehrmaligen Waschen mittels WB und einer Antikörperdetektion gegen das hAGO2 analysiert (siehe Abb.9).

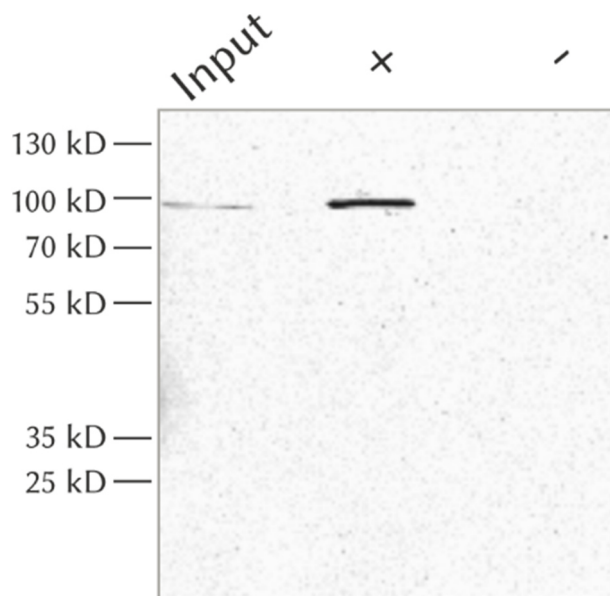


Abbildung 9: WB eines hAGO2 Pulldown aus K562 Lysaten mit einem biotinylierten LNA-Oligonukleotid

Western Blot Analyse von hAGO2. In der ersten Gelbahn ist unbehandeltes K562 Lysat aufgetragen, in der zweiten Bahn K562 Lysat, welches über Nacht mit 200 nM biotinyliertem LNA-Oligonukleotid inkubiert und in der dritten Bahn Zelllysate, welches ebenfalls mit Streptavidin-Beads, jedoch ohne biotinyliertes Oligonukleotid inkubiert wurde. Die Antikörper Detektion ist mittels Röntgenfilmen durchgeführt worden.

Wie in Abb. 9 zu sehen ist kann eine einzelne Proteinbande auf einer Höhe von ca. 100 kDa detektiert werden, was der Größe des hAGO2-Proteins entspricht. Dies trifft auf die Input Kontrolle zu, welche ohne Beads und Oligonukleotid inkubiert wurde sowie auf die Hauptprobe, bei welcher das Zelllysate mit biotinylierter LNA und magnetischen Streptavidin-Beads behandelt wurde. Des Weiteren kann das hAGO2-Protein deutlich

durch den Pulldown angereichert werden, was die intensivere Proteinbande in der zweiten Bahn des Blots zeigt. Durch die Negativkontrolle, welche auf die dritte Gelbahn aufgetragen wurde, sollen unspezifische Bindungen an die verwendeten Streptavidin-Beads überprüft werden. Hierbei wurde das Zelllysate mit Streptavidin-Beads, aber ohne LNA-Oligonukleotid inkubiert, woraufhin keine Proteinbande detektiert werden konnte. Dies bestätigt die Spezifität des Pulldowns und zeigt, dass keine unerwünschten Wechselwirkungen durch die verwendeten Beads auftreten und ausreichend Waschschr tte durchgeführt wurden.

3.1.2. RELATIVE EXPRESSION VON PIM1, P21 UND MIR-20A

Nach dem erfolgreichen Pulldown von miR-20a beladenen hAGO2-Proteinen durch das LNA-Antimir wurden als nächster Schritt die Expressions-Spiegel von miR-20a, der *PIM1* und *P21* mRNA in unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Um deutliche Expressionsunterschiede nach einer Behandlung mit dem bifunktionellen Adapter erhalten zu können, ist ein hohes Expressions-Spiegel der miRNA sowie der *PIM1* mRNA wünschenswert, wobei gleichzeitig ein niedriges *P21* mRNA-Spiegel vorhanden sein sollte. Hierfür wurden mit den Zelllinien SKOV3, HeLa und K562 RT-qPCR Experimente durchgeführt und die Expression der drei Faktoren vergleichend analysiert. Die relative Expression der drei Faktoren ist in Abb. 10 gezeigt, wobei die Suspensionszelllinie K562 im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien die optimalsten Voraussetzungen aufzeigt. Die miR-20a und *PIM1* mRNA Expression ist in K562-Zellen doppelt so hoch wie in SKOV3 und HeLa-Zellen. Die *P21* mRNA Expression liegt hingegen unter der in HeLa Zellen und ist um mehr als die Hälfte geringer als die *PIM1*-Expression in K562 Zellen. Dieses Expressionsmuster ermöglicht die Analyse eines deutlichen Effekts auf die Repression der PIM1 Expression sowie der Derepression der P21 Expression in K562-Zellen.

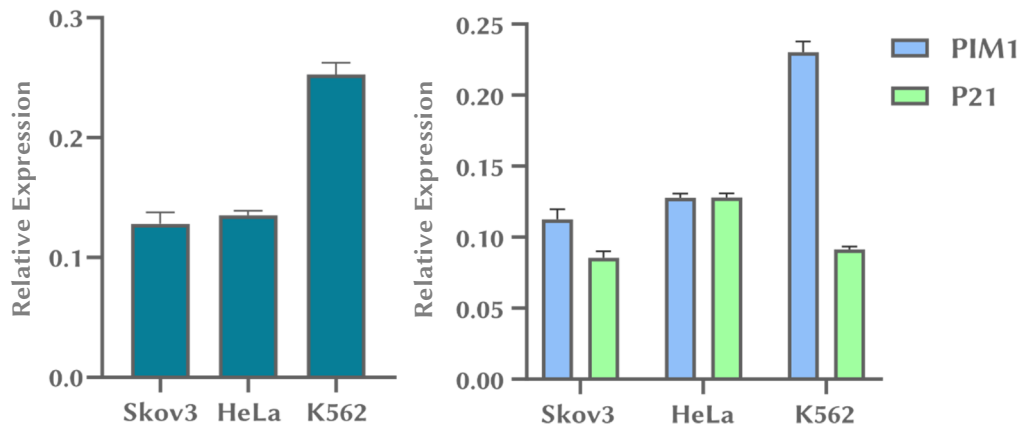


Abbildung 10: RT-qPCR Analyse der miR-20a, *PIM1* und *P21* mRNA-Spiegel in SKOV3, HeLa und K562-Zellen

Die RT-qPCR Analyse der miR-20a ist im linken Graphen, die Analyse der mRNA-Spiegel von *PIM1* und *P21* in SKOV3, HeLa und K562-Zellen im rechten Graphen abgebildet. Normalisiert wurde im Fall der miR-20a auf die Expression der U6 snRNA; im Fall der mRNA-Spiegel auf die β -Aktin Expression. In den Graphen sind jeweils die Werte zweier unabhängiger Experimente mit 2-3 technischen Replikaten zusammengefasst.

3.1.3. ANALYSE DER TRANSFEKTIONS-EFFIZIENZ IN K562-ZELLEN

Auch wenn das Expressionsmuster in K562-Zellen für die Testung des bifunktionalen Adapters optimal ist, zählt diese Suspensionszelllinie zu den schwer zu transfizierenden Zelllinien. Für eine erfolgreiche Transfektion von Fremd-DNA oder -RNA kann hierbei meistens nur eine Elektroporation durchgeführt werden. Da diese jedoch mit einem erheblichen Zelltod sowie einem hohen Materialverbrauch einhergeht, wurde ein Transfektionstest mit LipofectamineTM2000 durchgeführt. Dafür wurde das Standardprotokoll des Herstellers abgeändert, wobei ein Zentrifugationsschritt sowie ein veränderter Mediumwechsel nach der Transfektion getestet wurden. Der zusätzliche Zentrifugationsschritt soll die physische Annäherung der gebildeten Lipopartikel zu den Zellen fördern, was einer der Hauptgründe für die verminderte Transfektionseffizienz bei Suspensionszellen ist.

Um die optimalen Bedingungen ermitteln zu können, wurde nach der Zugabe der Transfektionslösung (LipofectamineTM2000, jeweiliges Medium und GFP Plasmid) ein Zentrifugationsschritt von 15 oder 30 min bei 37 °C und 1000 rpm hinzugefügt. Zusätzlich wurde getestet, ob das eingesetzte Medium einen Einfluss auf die

Transfektionseffizienz besitzt. Hierbei wurde normales RPMI Medium oder das Minimalmedium Opti-MEMTM verwendet. In Abb. 11 ist die relative GFP-Fluoreszenzintensität der behandelten K562-Zellen gezeigt, mit welcher auf die Effizienz der Transfektion zurückgeschlossen werden kann. Die höchste Intensität wird durch den längeren Zentrifugationsschritt von 30 min erreicht, welche sogar höher als die Intensität der HeLa-Kontrollprobe liegt. Ob 0,5 oder 1,2 µg Plasmid verwendet werden, scheint hierbei keinen großen Einfluss zu haben, wohingegen die Verwendung des Minimalmediums einen förderlichen Einfluss hat. Da die Transfektionseffizienz durch eine 30-minütige Zentrifugation verbessert werden konnte, wurden alle nachfolgenden Transfektionen in K562-Zellen nach dieser Methode durchgeführt.

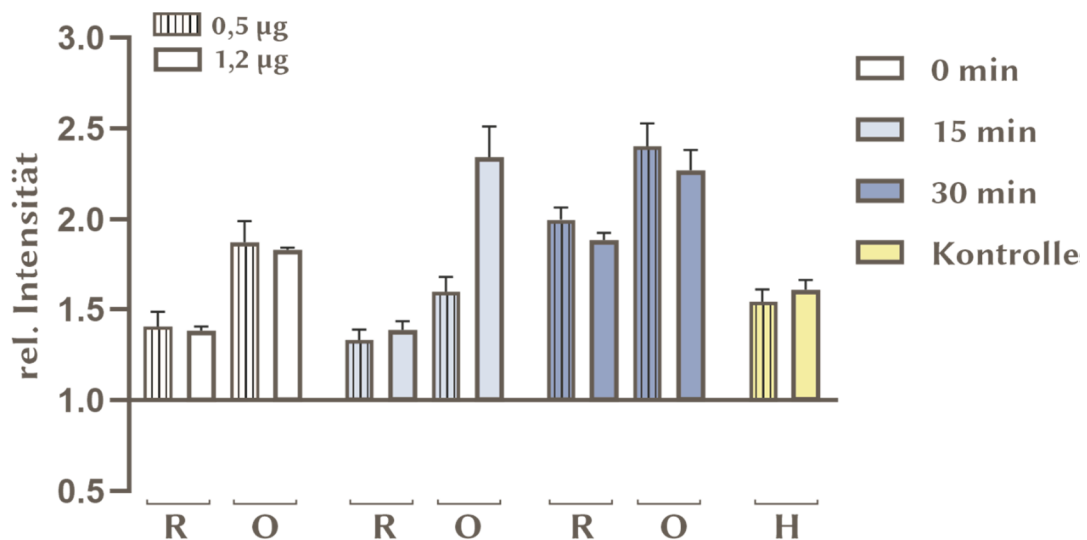


Abbildung 11: Transfektionstest eines GFP Plasmids in K562-Zellen mit LipofectamineTM2000

Optimierung der Transfektionseffizienz mit LipofectamineTM2000 in K562-Zellen. Es wurden 0,5 oder 1,2 µg des GFP Plasmids transfiziert. Dies wurde entweder in RPMI Medium (R) oder im Minimalmedium Opti-MEM (O) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen für 0, 15 oder 30 min bei 37 °C und 1000 rpm zentrifugiert und nach 48 Stunden die Fluoreszenz im Tecan Safire 2 Gerät analysiert. Als Positivkontrolle wurden adhärenente HeLa-Zellen verwendet. Normalisierung der Fluoreszenzintensität erfolgte auf die Grundfluoreszenz der Mock Proben unter den jeweilig durchgeführten Bedingungen. Im Graphen sind die Daten zweier unabhängiger Experimente mit jeweils 3 technischen Replikaten zusammengefasst.

mittlere Bande liegt dabei auf einer Höhe von 34 kDa, was der Größe der kleinen PIM1 Isoform entspricht. Bei der oberen Bande handelt es sich am wahrscheinlichsten um die phosphorylierte Form von PIM1, was auch schon in mehreren Publikation gezeigt werden konnte (Y. Liu et al., 2019; Muraski et al., 2007). Es könnte sich ebenfalls um die sumolierte Form von PIM1 handeln, jedoch ist hierbei ein größerer Shift nach oben zu erwarten und deswegen eher unwahrscheinlich (Iyer et al., 2017). Da das Erscheinen der unteren Bande konstant zur Proteinkonzentration auftritt, handelt es sich hierbei vermutlich um eine unspezifische Antikörperreaktion. Bei P21 zeigt sich ebenfalls bei einigen Detektionen eine Doppelbande, wobei es sich auch hier bei der oberen Bande wahrscheinlich um das phosphorylierte Protein handelt (Dash & El-Deiry, 2005).

Da bei diesem Experiment die Expression von zwei unterschiedlichen Proteinen untersucht wurde, sind mehrere positiv sowie negativ Kontrollen eingesetzt worden. Die Kontrollen wurden in allen WB Analysen dieser Arbeit mit der gleichen Konzentration transfiziert, die der höchsten eingesetzten Konzentration der Hauptprobe im Experiment entspricht. Abweichungen davon sind im jeweiligen Experiment angegeben. Zu den Positivkontrollen gehören die siRNA1491 und das miR-33a mimic, welche beide an die *PIM1* mRNA binden können, wodurch ein negativer Effekt auf die Proteinexpression von PIM1 zu erwarten ist. Eine weitere Positivkontrolle stellt die miR LNA da, deren Sequenz komplementär zur miR-20a vorliegt, wodurch die Derepression der P21 Expression überprüft werden kann. Als Negativkontrolle wurde eine Leertransfektion (L) durchgeführt, damit ausgeschlossen werden kann, dass die Verwendung von LipofectamineTM2000 einen Einfluss auf die Proteinexpressionen hat. Des Weiteren wurde eine unbehandelte Zelllysate Probe (Mock) aufgetragen, sowie eine unspezifische siRNA (siRNA -) eingesetzt.

Wie in Abb. 13 zu sehen ist, zeigen sich bei P21 zwischen den verschiedenen Proben hohe Schwankungen in der Proteinexpression, die ebenfalls bei den Kontrollen auftreten. Eine stärkere Expression ist vor allem bei einer Konzentration von 500 nM und 1 µM von Adapter 9-s zu erkennen. Dies ist jedoch auch bei den Kontrollen L, siRNA- und siRNA1491 zu beobachten. Durch dieses Ergebnis kann keine genaue Aussage darüber getroffen werden, ob der derepressive Effekt auf die P21 Expression spezifisch durch das Einsetzen des Adapters zustande kommt oder durch unspezifische Effekte durch die Transfektion beeinflusst wird. Des Weiteren zeigt die Positivkontrolle siRNA1491

keinen Einfluss auf die PIM1 Expression, was die Interpretation der Effekte weiter erschwert, da dies auf eine schlechte Transfektionseffizienz hinweist. Ein möglicher Grund dafür könnte der Unterschied zwischen einem kurzen Oligonukleotid und dem im Transfektionstest verwendeten Plasmid liegen, da sich dabei die Transfektionseffizienz unterscheiden kann. Da jedoch durch Adapter 9-s eine Hochregulation von P21 zu beobachten war sowie ein gleichzeitiger, leichter Effekt auf die PIM1 Expression, wurden mit diesem Adapter weitere Wiederholungsexperimente durchgeführt.

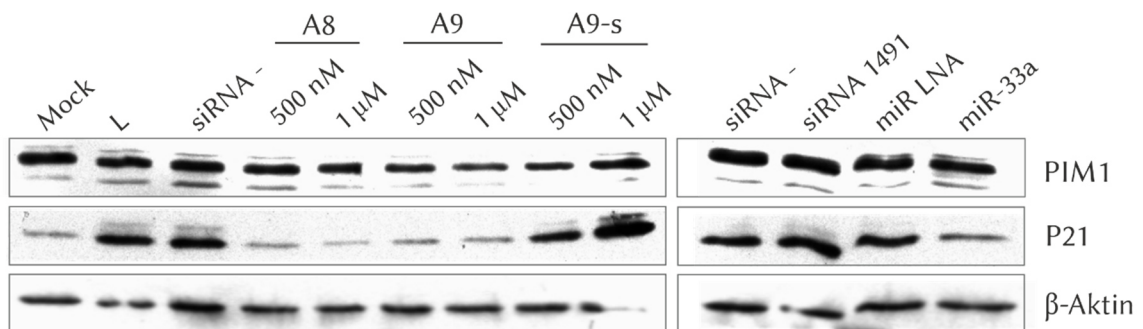


Abbildung 13: PIM1, P21 und β-Aktin WB nach K562 Transfektion mit Adapter 8, 9 und 9-s

Analyse der PIM1- (oben), P21 (mitte) sowie β-Aktin-Expression (unten) mittels WB. Die Adapter A8, A9 und A9-s wurden 48 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit Lipofectamine™2000 in K562-Zellen transfiziert sowie die Kontrollen siRNA (siRNA Negativkontrolle), siRNA1491, miR LNA (LNA Antimir gegen miR-20a) und miR-33a. Als weitere Kontrollen wurden ein unbehandeltes Zelllysate aufgetragen (Mock) und eine Transfektionsleerkontrolle (L). Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe von Röntgenfilmen durchgeführt.

Um ein mögliches Selbstbinden der Adapterbereiche ausschließen zu können, wurde bei einem Wiederholungsexperiment mit 500 nM Adapter 9-s eine 3-minütige Erhitzung bei 50, 75 oder 90 °C vor dessen Transfektion durchgeführt. Wie in Abb. 14 zu sehen ist, hat dies jedoch keinen Einfluss auf die Proteinexpression von PIM1 sowie P21. Im Vergleich zu den Negativkontrollen führt die Transfektion der siRNA1491 Kontrolle zu einer leichten Reduktion der PIM1 Expression, was für eine verbesserte Transfektionseffizienz spricht.

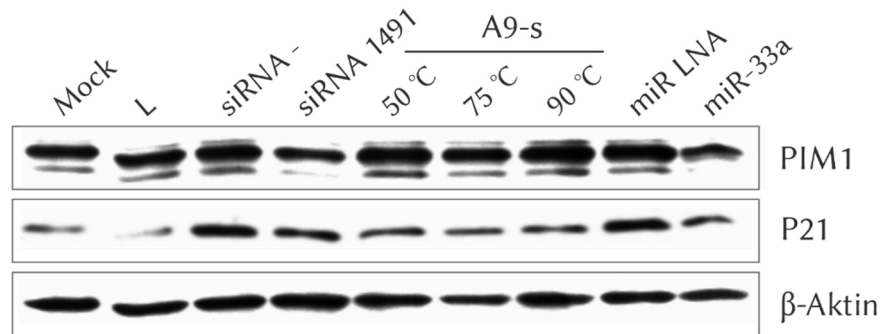


Abbildung 14: PIM1, P21 und β -Aktin WB nach K562 Transfektion mit Adapter 9-s

Detektion der PIM1- (oben), P21 (mitte) sowie β -Aktin-Expression (unten) mittels WB. Der Adapter 9-s, wurde 48 Stunden zuvor für 3 min auf 50 °C, 75 °C oder 90 °C erhitzt und anschließend jeweils 500 nM mit LipofectamineTM2000 in K562-Zellen transfiziert. Die Kontrollen siRNA - (siRNA Negativkontrolle), siRNA1491, miR LNA (LNA Antimir gegen miR-20a) und miR-33a wurden ebenfalls mit LipofectamineTM2000 transfiziert. Als weitere Kontrollen wurde ein unbehandeltes Zelllysate aufgetragen (Mock) und eine Transfektionsleerkontrolle (L). Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe von Röntgenfilmen durchgeführt.

Trotz verbesserter Transfektionseffizienz konnte wiederum kein erwünschter Doppeleffekt durch Adapter 9-s beobachtet werden. Da die Positivkontrolle siRNA1491 und miR LNA einen Einfluss auf die PIM1 sowie P21 Expression haben, kann davon ausgegangen werden, dass die Bindestelle innerhalb der *PIMI* mRNA und die miR-20a zugänglich sind. Eine weitere wichtige Rolle spielt jedoch das Vorkommen der jeweiligen gebundenen Faktoren innerhalb der Zelle. Wenn die miR 17 Familie im Vergleich zur *PIMI* mRNA in deutlich geringeren Mengen in der Zelle vorkommt, kann der Adapter zwar beide Ziel-Faktoren binden; der Effekt auf die *PIMI* mRNA wäre in diesem Fall jedoch so gering, dass dieser möglicherweise nicht über eine WB Analyse auswertbar ist.

3.1.5. ANALYSE DES BIFUNKTIONELLEN ADAPTER 21

In der Veröffentlichung von Vaz *et al.* von 2010, in welcher die Expression verschiedener miRNAs in K562-Zellen untersucht wurde, zeigt sich, dass die miR-17 Familie und vor miR-20a im Vergleich zu anderen miRNAs um einiges geringer in dieser Zelllinie exprimiert wird. Um ausschließen zu können, dass darin der Grund für den fehlenden Effekt auf die PIM1 Expression liegt, wurde das miRNA Target von der miR-17 zur let-7 miRNA Familie gewechselt. Wie bei Vaz *et al.* aufgeführt wird, ist die Expression der

let-7 Familie im Vergleich zur miR-17 Familie stärker in K562-Zellen ausgeprägt; vor allem let-7a zeigt eine über 20-fach höhere Expression im Vergleich zu miR-20a in K562-Zellen. Des Weiteren befinden sich innerhalb der 3'-UTR der *P21* mRNA mehrere Bindestellen, an welche miRNAs der let-7 Familie binden können (Farberov et al., 2015; B. Liu et al., 2015), was es ermöglichen könnte, weiterhin beide Zielproteine durch die Verwendung des bifunktionalen Adapters zu adressieren. Die Mitglieder der let-7 Familie sind im Gegensatz zur miR-17 Familie vor allem für ihre Rolle als Tumorsuppressoren bekannt. Dies macht sie eher ungeeignet für das Ziel eines Doppeleffektes auf ein Proto-Onkogen und Onkomir. Da hierfür allerdings zunächst ein erfolgreiches Umleiten von RISC-Komplexen und damit einhergehende Effekte nachgewiesen werden müssen, wurde die Untersuchung des doppelten Effektes in den folgenden Analysen nicht mehr stark fokussiert. Aus diesem Grund wurde die Seed Sequenz des LNA Bereichs für die nachfolgenden Experimente zur let-7 Seed Sequenz verändert und als Adapter 21 benannt. Die schematische Darstellung dessen ist in Abb. 15 zu sehen.

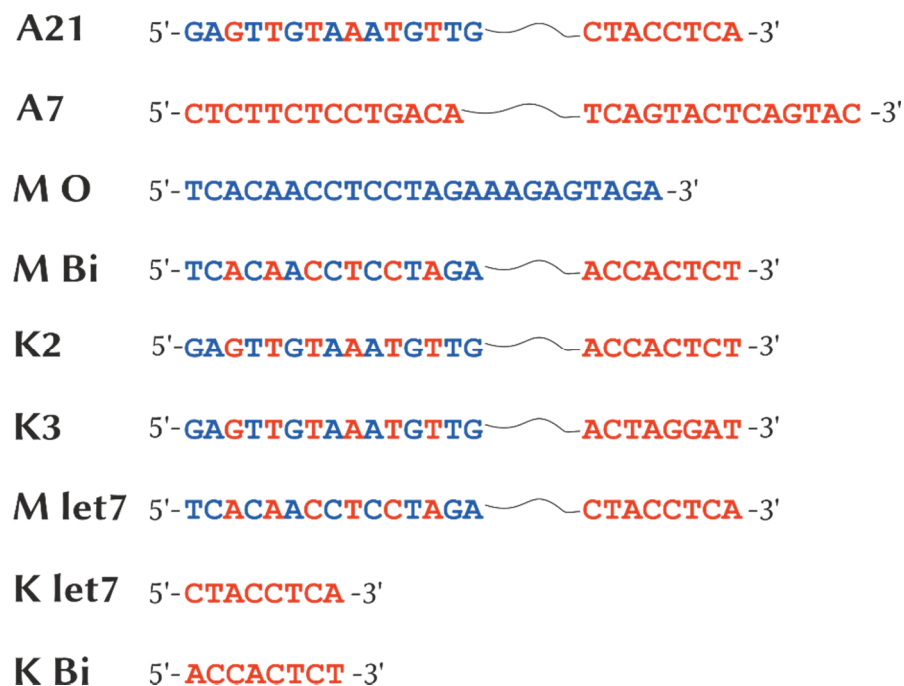


Abbildung 15: Schematische Darstellung weiterer Adapter-Kontrollen sowie des Adapter 21

Sequenzdarstellung des Adaptors 21 in 5'- zu 3'-Richtung. Ebenfalls dargestellt sind die Sequenzen der Kontrollen A7, M O, M Bi, K2, K3, M let7 und die beiden kurzen LNA-Oligonukleotide K let7 sowie K Bi. In Rot sind LNA- und in Blau DNA-Nukleotide gezeigt. Die geschwungene Linie im Fall der Adapter stellt den Polyethylenglykol-Linker dar, welcher die beiden Oligonukleotid-Bereiche des bifunktionalen Adapters verbindet.

Zusätzlich zur Sequenzänderung des Adapters wurde eine weitere Negativkontrolle getestet. Die Viabilität der K562-Zellen nach der Leertransfektion mit LipofectamineTM2000 war im Vergleich zu den anderen Proben optisch schlechter (nicht gezeigt), weswegen ein unspezifischer Adapter als Negativkontrolle verwendet wurde. Dieser Adapter 7 besitzt keine Spezifität zur *PIM1* oder *P21* mRNA, beinhaltet jedoch ebenfalls zwei mit einem Linker verbundene LNA-Nukleotid Bereiche und ist somit vergleichbarer zu den Adapter 21 Eigenschaften.

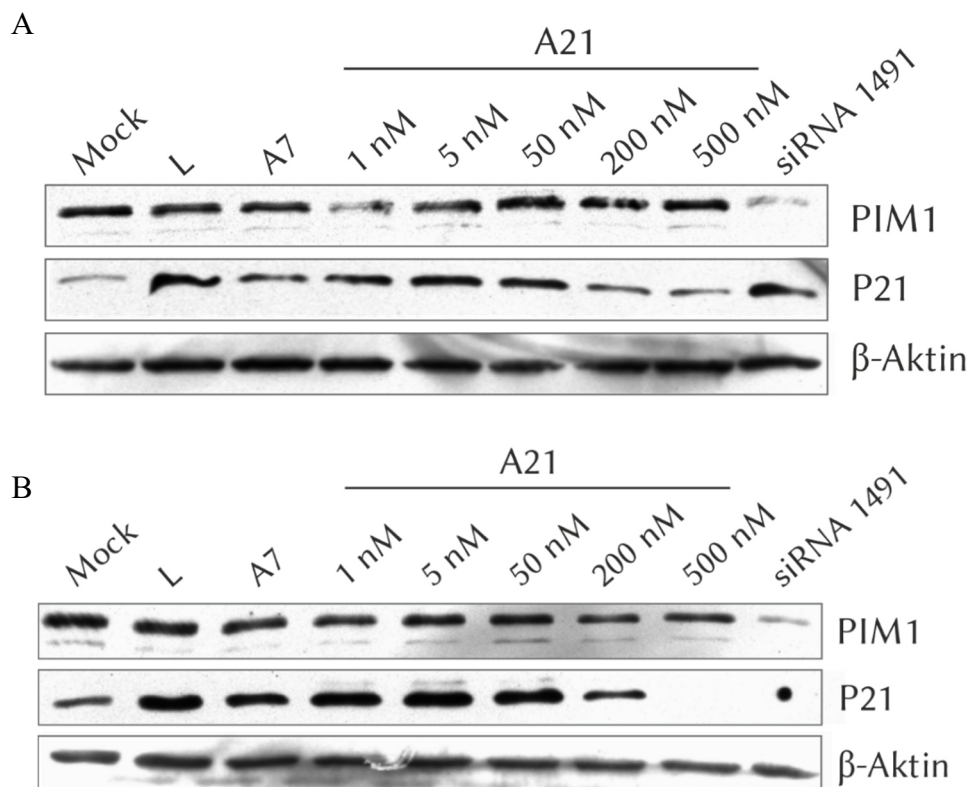


Abbildung 16: PIM1, P21 und β-Aktin WB Analyse nach K562 Transfektion mit Adapter 21

Detektion der PIM1- (oben), P21 (mitte) sowie β-Aktin-Expression (unten). Der Adapter A21 wurde 48 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit LipofectamineTM2000 in K562-Zellen transfiziert. Die Transfektionskontrolle siRNA1491 und der unspezifische Adapter 7 wurden ebenfalls mit LipofectamineTM2000 transfiziert. Als weitere Kontrollen wurde ein unbehandeltes Zelllysats aufgetragen (Mock) und eine Transfektionsleerkontrolle (L). Die Antikörperdetektion wurde mit Röntgenfilmen durchgeführt.

Wie in Abb. 16A zu sehen ist, zeigt der unspezifische Adapter 7 ein ähnliches Bandenmuster wie die Mock Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist die P21 Expression in der Leertransfektion Kontrolle stärker, was möglicherweise auf eine Stressinduktion zurückzuführen ist und schon in den vorangegangenen WB-Analysen zu beobachten war.

Der Adapter 21 zeigt bei einer Konzentration von 1 nM einen deutlichen Effekt auf die PIM1 Expression, welcher vergleichbar mit der Positivkontrolle siRNA1491 ist. Hierbei liegt jedoch keine Expressionsveränderung bei P21 vor. Diese kann erst bei 50 nM und 500 nM festgestellt werden, wobei jedoch kein repressiver Effekt auf die PIM1 Expression zu beobachten ist. Bei einem Wiederholungsexperiment (B) konnte dieser Trend nicht mehr reproduziert werden. Hier wird die P21 Expression bei einer Adapter-Konzentration von 200 nM und 500 nM wieder geringer und es ist nur ein minimaler Effekt bei PIM1 sichtbar.

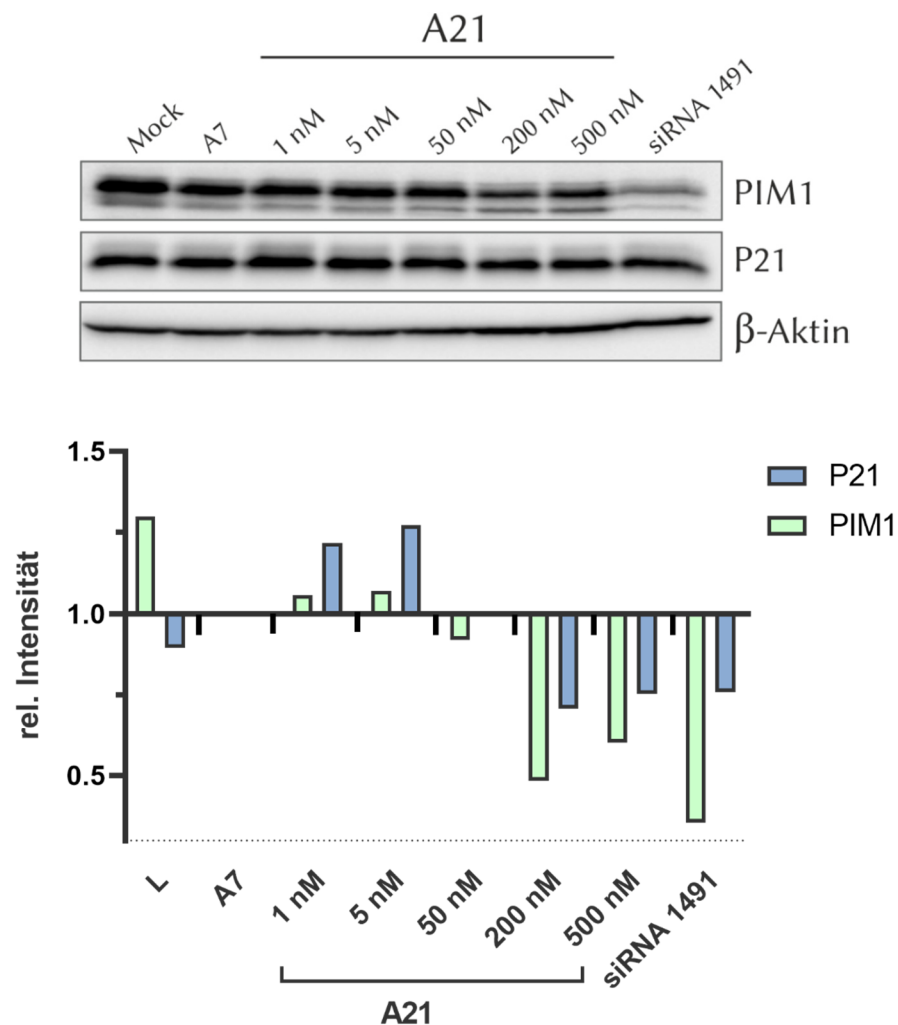


Abbildung 17: PIM1, P21 und β-Aktin WB Wiederholung nach K562 Transfektion mit Adapter 21

Detektion der PIM1- (oben), P21 (mitte) sowie β-Aktin-Expression (unten). Der Adapter A21 wurde 48 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit Lipofectamine™2000 in K562-Zellen transfiziert. Die Transfektionskontrolle siRNA1491 und der unspezifische Adapter 7 wurden ebenfalls mit Lipofectamine™2000 transfiziert. Als weitere Kontrollen wurde ein unbehandeltes Zelllysate aufgetragen (Mock) und eine Transfektionsleerkontrolle (L). Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (unterer Graph). Normalisiert wurde auf die Intensität der β-Aktin Banden sowie auf Kontrolle A7.

Bei einer Antikörper Detektion mittels Röntgenfilmen kommt es teilweise zu weniger klar definierten Banden und Doppelbanden, die durch leichte Verschiebungen des Films hervorgerufen werden sowie zu einer unvollständigen Detektion des Blots (s. Abb. 16). Da diese Problematik vor allem durch das Auflegen der Röntgenfilme zustande kommt, wurde bei den folgenden Experimenten ein ChemiDoc Gerät verwendet, bei welchem das Signal digital zu verschiedenen Zeiten aufgenommen wird und so ebenfalls in Bezug auf die Proteinbeladung besser ausgewertet werden kann. Die Normalisierung der Bandenintensität erfolgt im ersten Schritt auf die Intensität der β -Aktin Bande und im zweiten Schritt auf die der Normalisierungsprobe, die zur besseren Visualisierung als 1 gesetzt wird.

Die WB-Analyse in Abb. 17, welche in der ChemiDoc Anlage detektiert wurde, zeigt einen ähnlichen Trend zu dem Experiment in Abb. 16 B. Die Reduktion der PIM1 Expression nimmt mit der Erhöhung der Konzentration des Adapters zu, was jedoch ebenfalls auf die Expression von P21 zutrifft. Somit kann auch bei mehrmaliger Wiederholung der Testung des Adapter 21 kein stabiler derepressiver Effekt auf P21 festgestellt werden. Des Weiteren wurden vor allem in ersten WB-Analysen (Abb.13 und 16) starke Expressionsschwankungen bei P21 festgestellt, was vor allem bei einem Vergleich der Mock Probe mit der Leetransfektions Probe deutlich wird. Die Untersuchung des Adapter-Effektes in Bezug auf die P21 Expression wurde daraufhin beendet.

3.1.5.1. UNTERSUCHUNG DES ANTISENSE EINFLUSS DES MIXMER BEREICHS

Da in den vorangegangenen Experimenten immer wieder ein Einfluss auf die PIM1 Expression durch Adapter 21 beobachtet werden konnte, wurden weitere Kontrollen getestet, um diesen Effekt besser interpretieren zu können. Hierfür wurden die Kontrollen K2 und K3 ausgewählt, um den Antisense Effekt, der durch Adapter 21 ausgelöst werden kann, untersuchen zu können. Durch den Mixmer-Bereich des Adapters kann, neben der Umleitung des RISC-Komplexes, ebenfalls eine sterische Blockade durch die Bindung des Oligonukleotids zustande kommen und somit auch zu einer translationalen Inhibition

führen. Um den Antisense Effekt vom Umleitungseffekt des RISC-Komplexes unterscheiden zu können, wurde der LNA-Bereich des Adapters bei den Kontrollen K2 und K3 zu einer unspezifischen Sequenz ausgetauscht, wobei der Mixmer-Bereich weiterhin an die *PIM1* mRNA binden kann. Dadurch kann der Einfluss des möglichen Antisense Effektes auf die PIM1 Expression direkt mit der Beeinflussung durch die Umleitung des RISC-Komplexes verglichen werden.

Wie in den WB Bildern in der Abb. 18 zu erkennen ist, haben die Kontrollen K2 und K3 bei allen drei WB Experimenten kaum bis keinen negativen Effekt auf die PIM1 Expression. Des Weiteren schwanken die Effekte durch Adapter 21 innerhalb der Experimente wiederum stark, sodass bei dem ersten Versuch in Abb. 18 schon eine Reduktion der PIM1 Expression ab 1 nM, in Versuch 2 jedoch erst ab 200 nM sichtbar ist. Auch die Transfektionseffizienz zeigt sich innerhalb der Wiederholungsexperimente instabil, was durch die Positivkontrolle siRNA1491 deutlich wird. Dabei erreicht diese im Western Blot in Abb. 18 A nur eine etwa 30 %ige Reduktion der PIM1 Expression. Im dritten Western Blot (C) scheint dies auch zuzutreffen, jedoch liegt dies hierbei an der schwachen PIM1 Expression in der Negativkontrolle A7, welche zur Normalisierung der Blot-Intensität verwendet wurde. Auf dem WB Bild selbst ist eine geringere PIM1 Expression sichtbar.

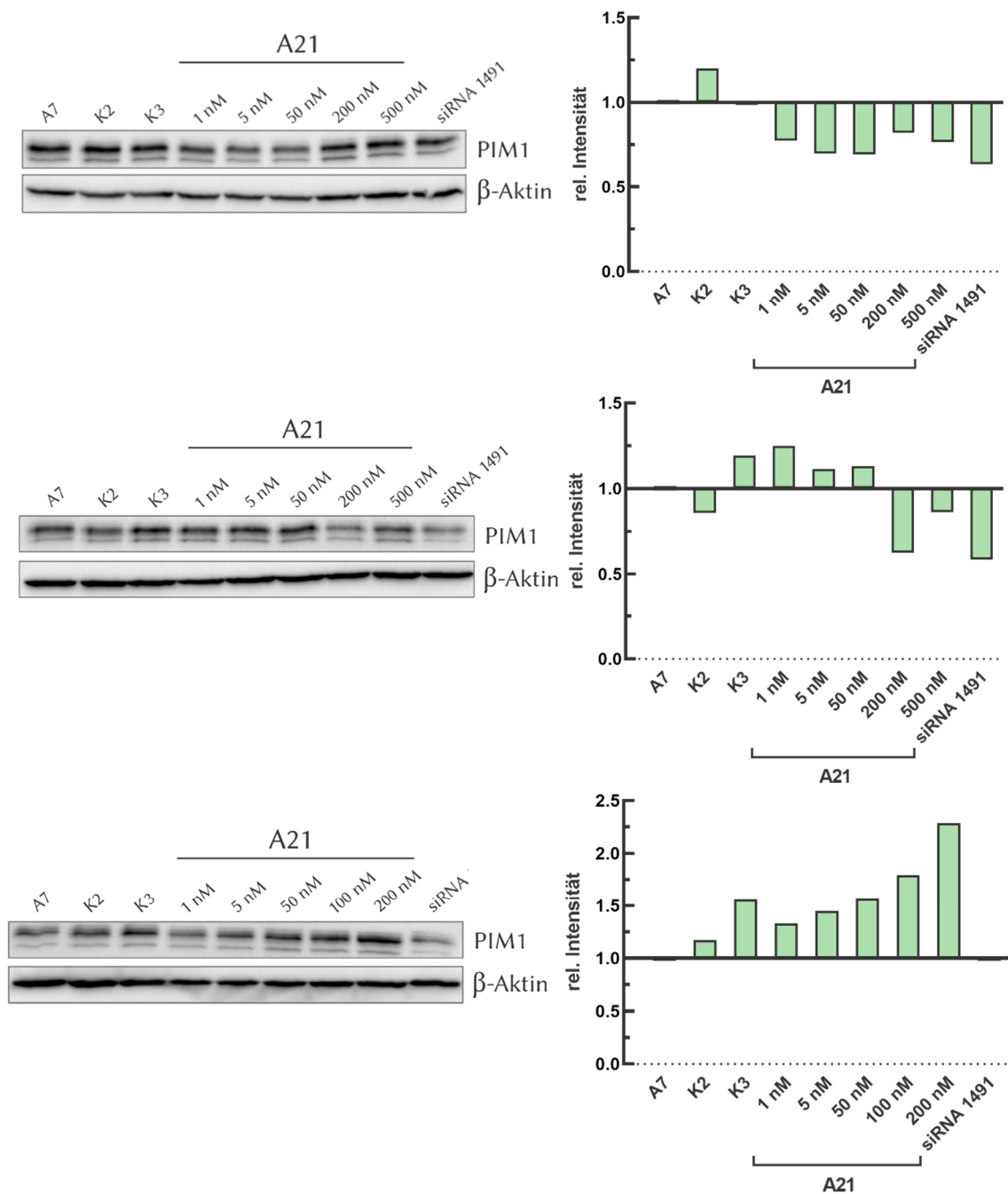


Abbildung 18: WB-Analyse nach K562 Transfektion mit Adapter 21

Detektion der PIM1- sowie β -Aktin-Expression mittels WB. Der Adapter A21 wurde 48 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit LipofectamineTM2000 in K562-Zellen transfiziert. Die Transfektionskontrolle siRNA1491, die Kontrollen K2 und K3 und der unspezifische Adapter 7 wurden ebenfalls mit LipofectamineTM2000 transfiziert. Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (rechte Graphen). Normalisiert wurde auf die Intensität der β -Aktin Banden, sowie auf Kontrolle A7.

3.1.6. UNTERSUCHUNG DES ADAPTER 21 EFFEKTS IN HELA-ZELLEN

Aufgrund der instabilen Transfektionseffizienz der weiter oben beschriebenen Ergebnisse wurde das Zellsystem von K562 auf HeLa-Zellen gewechselt. Da durch die adhärenz Eigenschaft der HeLa-Zellen eine bessere Effizienz der Transfektion zu erwarten ist, wurden wiederum drei Wiederholungsexperimente mit den Kontrollen K2 und K3 durchgeführt. Die Transfektionseffizienz ist wie erwartet deutlich verbessert und in allen drei Experimenten stabil, wie in Abb. 19 zu sehen ist. Ein Einfluss auf die PIM1 Expression ist im Vergleich zur Negativkontrolle A7 in allen drei Experimenten vorhanden, jedoch wiederum nicht stabil bei einer Konzentration zu beobachten, sondern tritt schwankend ab 5 nM bis 200 nM transfizierten Adapters auf. Die Kontrollen K2 und K3 zeigen teilweise eine leichte Reduktion in der PIM1 Expression, welche im Vergleich zum verwendeten Adapter 21 jedoch deutlich geringer ausfällt. Dies zeigt, dass auch in HeLa-Zellen der reprimierende Effekt auf PIM1 nicht durch antisense Effekte des Mixmer-Bereichs ausgelöst wird. Generell ist die Detektion von PIM1 in HeLa-Zellen deutlich schwächer als in K562-Zellen, was jedoch durch eine Anpassung der Antikörperkonzentration des primären Antikörpers von 1:3000 zu 1:1000 sowie eine längere Inkubationszeit des Sekundärantikörpers (um 30 min) verbessert werden konnte (ab Abb. 20 durchgeführt).

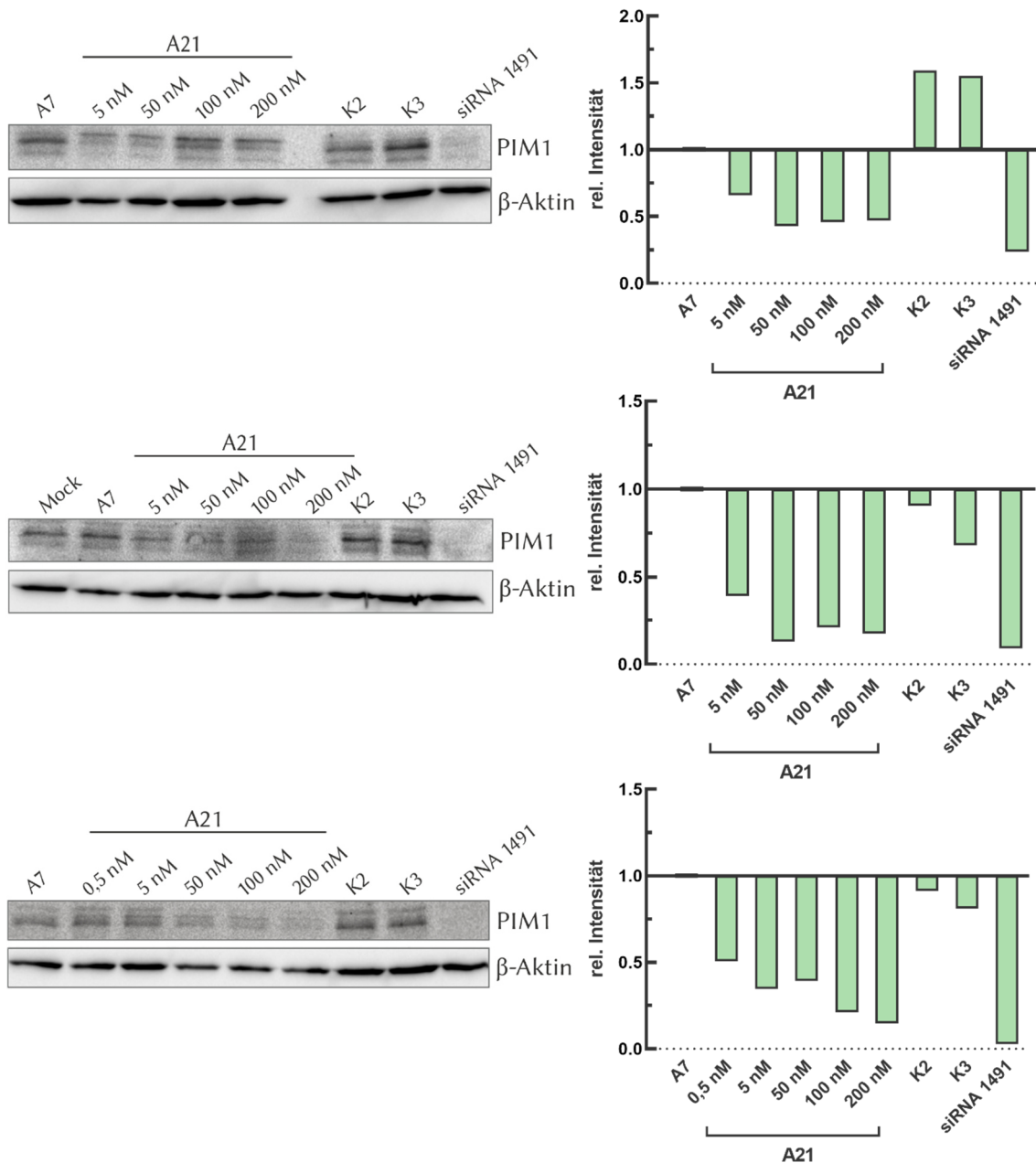


Abbildung 19: WB-Analyse nach HeLa Transfektion mit Adapter 21 und den Kontrollen K2 und K3

Detektion der PIM1- sowie β -Aktin-Expression mittels WB. Der Adapter A21 wurde 48 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit LipofectamineTM2000 in HeLa-Zellen transfiziert. Die Transfektionskontrolle siRNA1491, die Kontrollen K2 und K3 und der unspezifische Adapter 7 wurden ebenfalls mit LipofectamineTM2000 transfiziert. Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (rechte Graphen). Normalisiert wurde auf die Intensität der β -Aktin Banden, sowie auf Kontrolle A7.

3.1.6.1. **UNTERSUCHUNG DES LET-7 EINFLUSSES AUF DIE PIM1-EXPRESSION**

Neben dem möglichen Antisense-Einfluss durch den Mixmer-Bereich des Adapter 21 kann das Wegfangen der let-7 miRNA Familie ebenfalls zu unerwünschten Nebeneffekten führen. Um dies untersuchen zu können, wurde ein Kontroll Adapter verwendet, welcher gegen die Seed-Region der let-7 Familie gerichtet ist, jedoch mit einem unspezifischen Mixmer Oligonukleotid verbunden ist. Diese Kontrolle wird als M let7 bezeichnet. Ebenfalls wurden weitere Negativkontrollen hinzugefügt, welche als M O und M Bi benannt sind, um die Normalisierung der WBs zu verbessern. Bei der M O Kontrolle handelt es sich um ein DNA-Oligonukleotid, welches die gleiche Nukleotidlänge wie Adapter 21 besitzt, jedoch nicht durch einen flexiblen Linker getrennt ist. Dies ist jedoch der Fall bei dem unspezifischen Adapter M Bi, der die gleiche Sequenz wie M O trägt, jedoch neben dem Linker auch die chemischen Eigenschaften der LNA-Nukleotide von Adapter 21 besitzt. Somit kann mit Hilfe der M O Kontrolle untersucht werden, ob die LNA-Nukleotide oder der Linker einen Einfluss auf die PIM1 Expression besitzen. Bei der Sequenz dieser beiden Kontrollen handelt es sich um eine validierte Kontrollsequenz der Firma Dharmacon, welche auf der *C. elegans* miR-67 Sequenz basiert und im humanen System keine Nebeneffekte verursacht (miRIDIAN microRNA Mimics, Hairpin Inhibitors and Negative Controls).

Die Proteinexpression bei den Kontrollen M O und M Bi sind in den in Abb. 20 gezeigten Experimenten vergleichbar und zeigen wie erwartet keinen negativen Einfluss auf PIM1. Adapter 21 zeigt in Experiment A und B einen relativ starken Einfluss auf die PIM1 Expression, welcher jedoch im dritten Wiederholungsexperiment nicht reproduziert werden kann. Überraschenderweise tritt jedoch bei der Kontrolle M let7 ein Effekt auf, der vergleichbar mit der Repression des PIM1-Proteins bei der Adapter 21 Probe ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass entweder ein indirekter Einfluss durch die let-7 Familie auf PIM1 vorhanden ist oder der Adapter unspezifisch an die 3'-UTR der *PIM1* mRNA bindet und dadurch eine sterische Blockade zur verminderten PIM1 Expression führt.

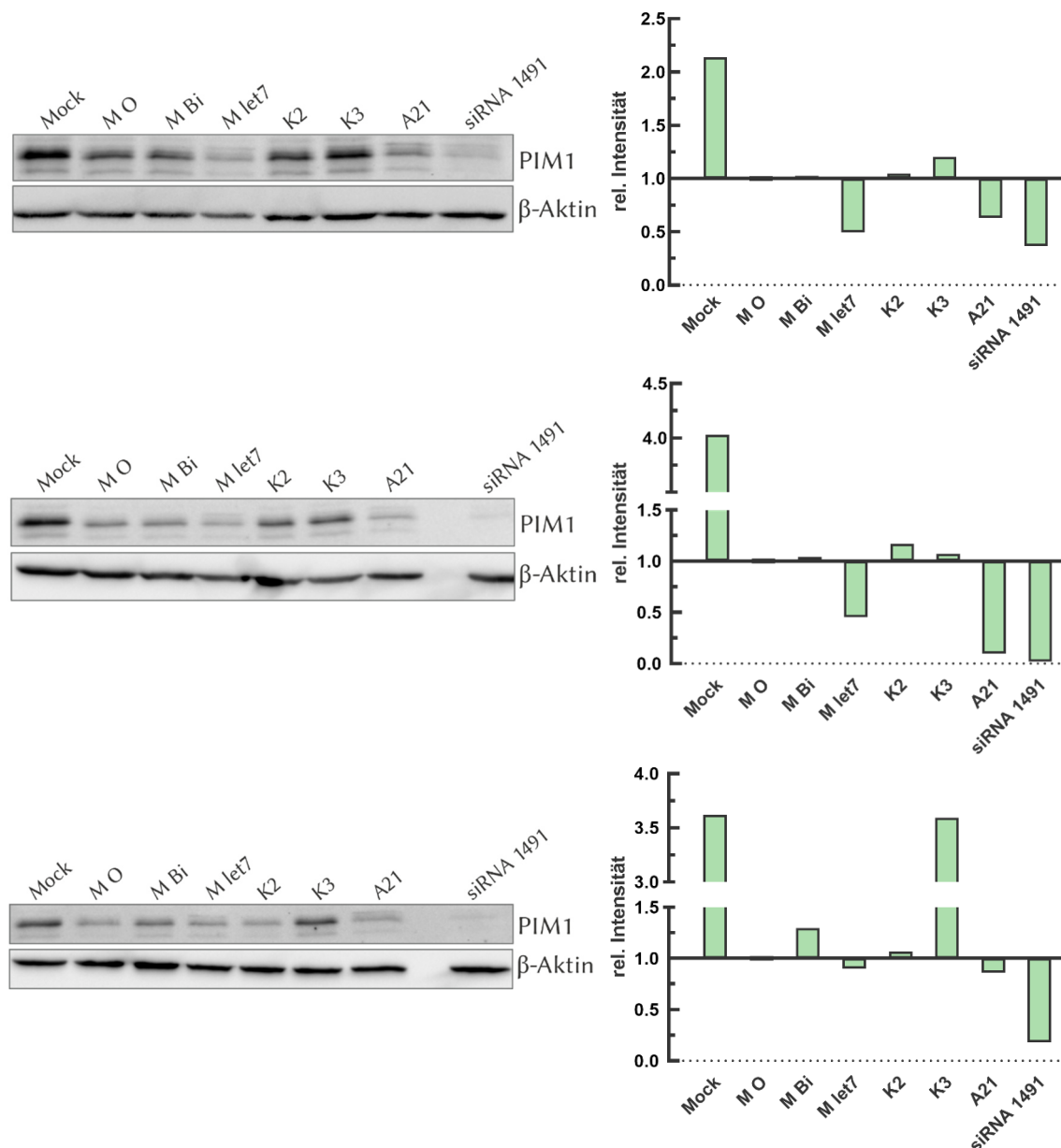


Abbildung 20: WB-Analyse mit weiteren Kontrollen nach HeLa Transfektion mit Adapter 21

Detektion der PIM1- sowie β-Aktin-Expression mittels WB. Der Adapter A21 wurde 48 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit Lipofectamine™2000 in HeLa-Zellen transfiziert. Die Transfektionskontrolle siRNA1491, die Kontrollen K2, K3, M O, M let7 und der unspezifische Adapter M Bi wurden ebenfalls mit Lipofectamine™2000 transfiziert. Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (rechte Graphen). Normalisiert wurde auf die Intensität der β-Aktin Banden sowie auf Kontrolle M O.

Um dies untersuchen zu können, wurden zwei kurze LNA-Oligonukleotide getestet. Eines dieser beiden 8-mer LNAs weist die gleiche Seed-Sequenz wie die des Adapter 21 LNA-Bereichs auf und ist dadurch in der Lage miRNAs der let-7 Familie zu binden. Kritisch zu betrachten sind jedoch die möglichen unspezifischen Nebeneffekte solch kurzer LNA Oligonukleotide, weswegen eine zweite kurze LNA Kontrolle (K Bi)

eingesetzt wurde. Diese trägt die unspezifische Sequenz des Adapter M Bi und dient dazu, die unter Umständen auftretenden toxischen Nebeneffekte aufzuzeigen. Im Vergleich dazu wäre ein kommerzieller und validierter Inhibitor gegen die let-7 Familie optimaler, bei welchem weniger Nebeneffekte sowie eine bestätigte Funktionalität vorliegt. Aus zeitlichen Gründen konnten jedoch nur die beiden kurzen LNA Oligonukleotide getestet werden.

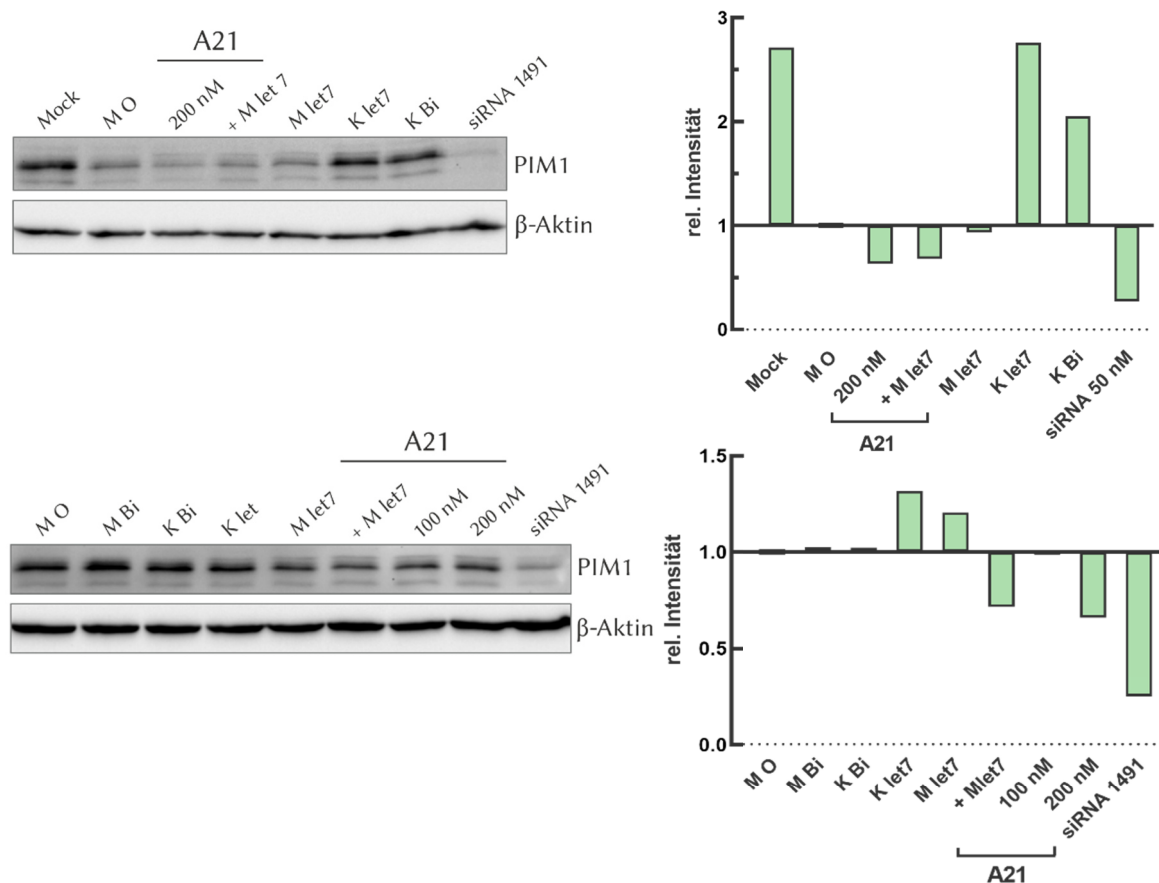


Abbildung 21: WB-Analyse der K Bi und K let Kontrolle sowie Co-Transfektion von M let7 nach HeLa Transfektion mit Adapter 21

Detektion der PIM1- sowie β-Aktin-Expression mittels WB. Der Adapter A21 wurde 48 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit LipofectamineTM2000 in HeLa-Zellen transfiziert. Die Transfektionskontrolle siRNA1491, die Kontrollen K Bi, K let7, M O, M let7 und der unspezifische Adapter M Bi wurden ebenfalls mit LipofectamineTM2000 transfiziert. Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (rechte Graphen). Normalisiert wurde auf die Intensität der β-Aktin Banden, sowie auf Kontrolle M O.

Neben der Untersuchung der Oligonukleotide K let7 und K Bi, wurde der Adapter 21 ebenfalls mit der Kontrolle M let7 co-transfiziert. Hierdurch kann untersucht werden, ob der negative Effekt auf die PIM1 Expression verstärkt oder konstant im Vergleich zur

alleinigen Verwendung des Adapter 21 verändert wird. Dies wurde in drei Experimenten getestet, welche in Abb. 21 und Abb. 23 gezeigt sind.

In den beiden Experimenten in Abb. 21 ist deutlich zu erkennen, dass weder die Kontrolle K let7 noch K Bi einen negativen Effekt auf die PIM1 Expression aufweisen. Somit ist ein indirekter Einfluss durch die Bindung der kurzen LNA an die let-7 Familienmitglieder unwahrscheinlich, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da nicht nachgewiesen wurde, ob die Kontrolle K let7 erfolgreich an die miRNAs der let-7 Familie bindet und diese in ihrer Funktion inhibiert. Eine toxische Nebenwirkung der Kontrollen ist jedoch auszuschließen, da optisch kein Unterschied in der Zellviabilität im Vergleich zu den anderen Proben festzustellen war.

Bei der Co-Transfektion von M let7 und Adapter 21 ist in den beiden Experimenten in Abb. 21 zu erkennen, dass eine leichte Steigerung des Effekts beginnend von alleiniger Transfektion von M let7, Co-Transfektion beider Adapter bis hin zu Adapter 21 auftritt. Da die Expressionsunterschiede jedoch nur gering sind, ist ein unspezifisches Binden und eine damit einhergehende sterische Blockade unwahrscheinlich. In diesem Fall wäre ein stärkerer Effekt bei der Co-Transfektion zu erwarten, da hierbei eine Summierung des Adapter-Effekts und der sterischen Blockade auftreten würde. Diese Vermutung trifft jedoch nur zu, wenn ein reprimierender Effekt durch Adapter 21 vorhanden ist. Es lässt sich generell keine klare Aussage darüber treffen, was für die reprimierende PIM1 Expression bei Kontrolle M let7 verantwortlich ist.

3.1.6.2. TRANSFEKTION MIT LIPOFECTAMINETM3000

Da im Vergleich zu K562-Zellen bei einer Transfektion in HeLa-Zellen vermehrt stärkere Stresssymptome wahrnehmbar waren, wurde das Transfektionsreagenz LipofectamineTM3000 getestet. Hierbei soll nach Angaben der Firma ThermoFisher Scientific eine verbesserte Effizienz ermöglicht werden und gleichzeitig geringere Toxizität durch die Transfektion auftreten. Die ersten Tests des neuen Transfektionsmittels sind in Abb. 22 dargestellt. Dabei zeigt sich im ersten Experiment ein sehr deutlicher Effekt durch Adapter 21, welcher ebenfalls stärker als der durch M let7 hervorgerufene Effekt auf die PIM1 Expression ist. Dies ist jedoch im

Wiederholungsexperiment nicht mehr reproduzierbar, wo nur noch ein leichter Einfluss durch Adapter 21 zu beobachten ist. Um einen Gesamtüberblick über den Einfluss des neuen Transfektionsreagenz zu bekommen, wurde der Experimentansatz wiederholt, welcher in Abb. 21 gezeigt ist. Rein visuell zeigten die transfizierten HeLa-Zellen bei allen Experimenten eine deutlich bessere Verträglichkeit im Vergleich zur Verwendung von LipofectamineTM2000 (nicht gezeigt). Jedoch kann kein stabilerer Effekt durch den Adapter 21 festgestellt werden, welcher in Abb. 23 ebenfalls nur einen leichten Einfluss auf die PIM1 Expression zeigt.

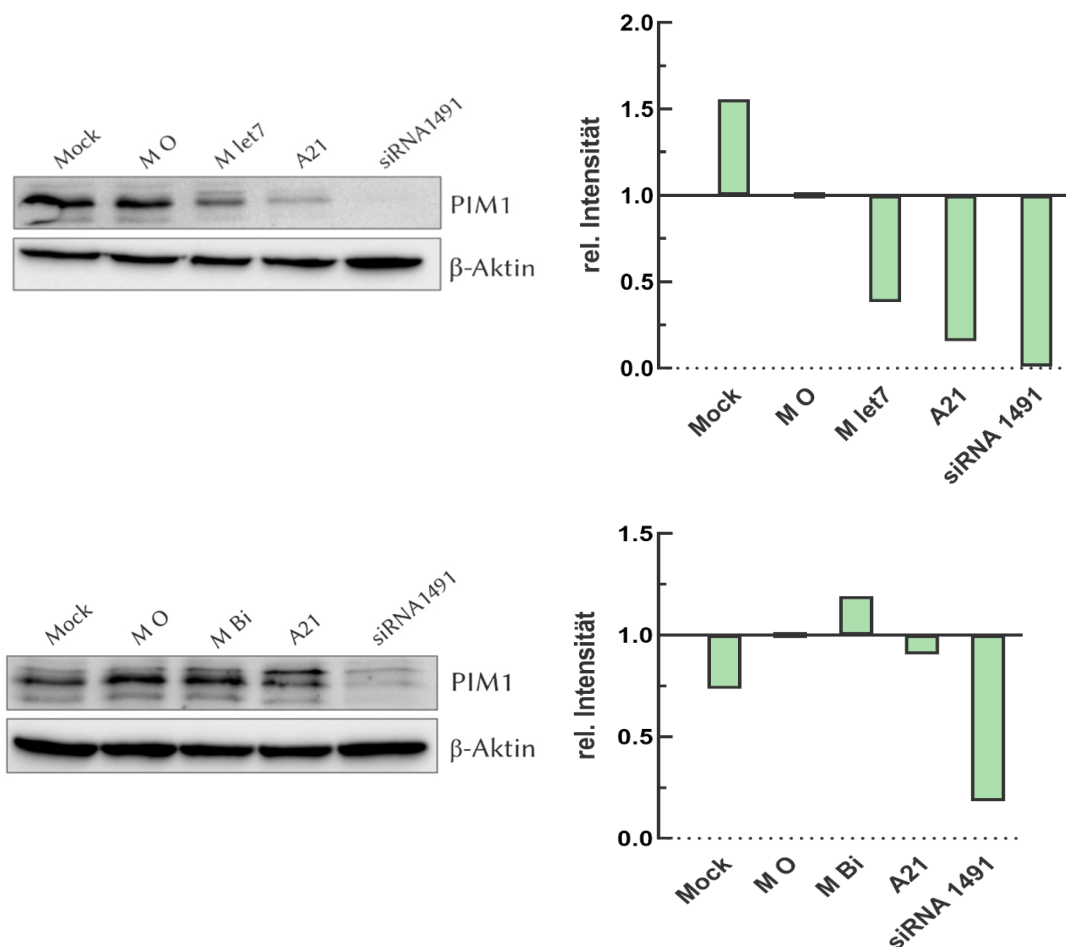


Abbildung 22: WB-Analyse nach LipofectaminTM3000 Transfektion in HeLa-Zellen

Detektion der PIM1- sowie β -Aktin-Expression mittels WB. Die Transfektion wurde 48 Stunden zuvor mit LipofectamineTM3000 in HeLa-Zellen transfiziert, wobei 200 nM des Adapters A21 verwendet wurden. Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (rechte Graphen). Normalisiert wurde auf die Intensität der β -Aktin Banden, sowie auf Kontrolle M O.

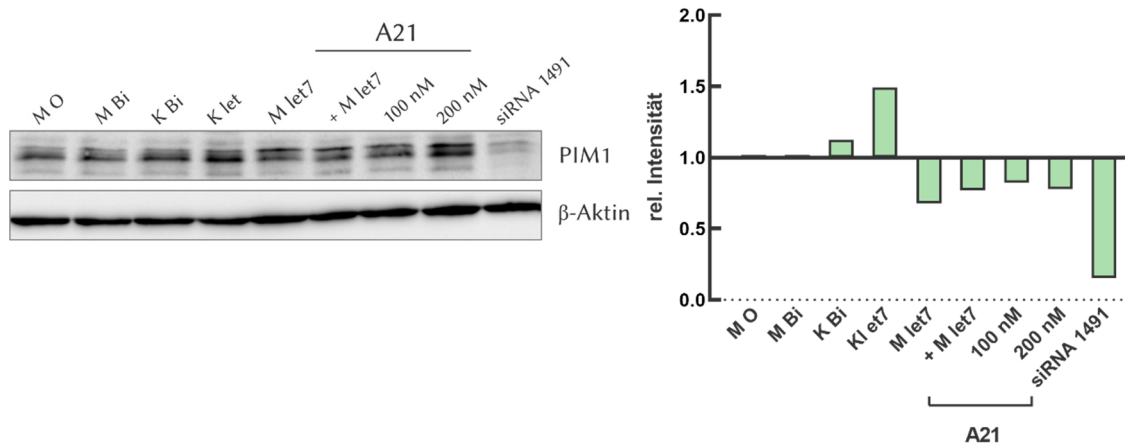


Abbildung 23: WB-Analyse nach LipofectamineTM3000 Transfektion mit allen Kontrollen in HeLa-Zellen

Detektion der PIM1- sowie β -Aktin-Expression mittels WB. Die Transfektion wurde 48 Stunden zuvor mit LipofectamineTM3000 in HeLa-Zellen durchgeführt. Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (rechter Graph). Normalisiert wurde auf die Intensität der β -Aktin Banden, sowie auf Kontrolle M O.

Um ausschließen zu können, dass die Testungen in HeLa-Zellen im suboptimalen Konzentrationsspektrum durchgeführt wurden, sind Titrationsexperimente im Bereich von 5 – 250 nM durchgeführt worden. Zur Normalisierung wurde der Kontroll-Adapter K2 in gleichen Konzentrationen transfiziert. Bei den beiden durchgeführten Experimenten, welche in Abb. 24 gezeigt sind, wurde die Normalisierung unterschiedlich durchgeführt. Im ersten Experiment wurde die durch die ImageLab Software gemessene Intensität vergleichend aufgetragen. Bei einer Konzentration von 5 nM ist hierbei ein deutlicher Unterschied zwischen Adapter 21 und K2 zu sehen, wobei die PIM1 Expression um über 50 % reduziert ist. Dieser Effekt verliert sich jedoch ab einer Konzentration von 200 nM.

Da parallel eine weitere Transfektion einschließlich Testung der Positivkontrolle siRNA1491 durchgeführt wurde (Abb. 23), konnte diese beim zweiten Titrationsexperiment durch die Kontrolle Mock ersetzt werden. Dadurch erfolgte eine Normalisierung der Bandenintensität auf die Mock Negativkontrolle, was eine klarere Auswertung ermöglichte. Hierbei tritt bei einer Adapter 21 Konzentrationen von 50 nM sowie 250 nM eine Reduktion der PIM1 Expression auf, wobei die Kontrolle K2 wiederum keinen negativen Effekt auf die Proteinexpression zeigt. Der Trend des ersten Titrationsexperiments, bei welchem eine Reduktion von PIM1 nur unterhalb einer Adapterkonzentration von 200 nM feststellbar ist, kann dabei nicht bestätigt werden.

Diese Wirkungsschwankungen konnten bereits in vorangegangenen Experimenten in HeLa sowie K562-Zellen beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass PIM1 bei verschiedenen Stressstimuli auf Proteinebene stabilisiert werden kann (Blanco et al., 2016). Da die Zellen während und nach der Transfektion einem gewissen Stress ausgesetzt sind, könnte eine dadurch auftretende Stabilisierung auf Proteinebene eine durch den Adapter ausgelöste mRNA Degradation überdecken. Um dies ausschließen zu können, wurden Dual-Luciferase Assays durchgeführt. Hierbei kann der Adapter-Effekt unabhängig von der PIM1 Proteinexpression untersucht werden, da die Aktivität des Renilla Luciferase Reporterproteins analysiert wird.

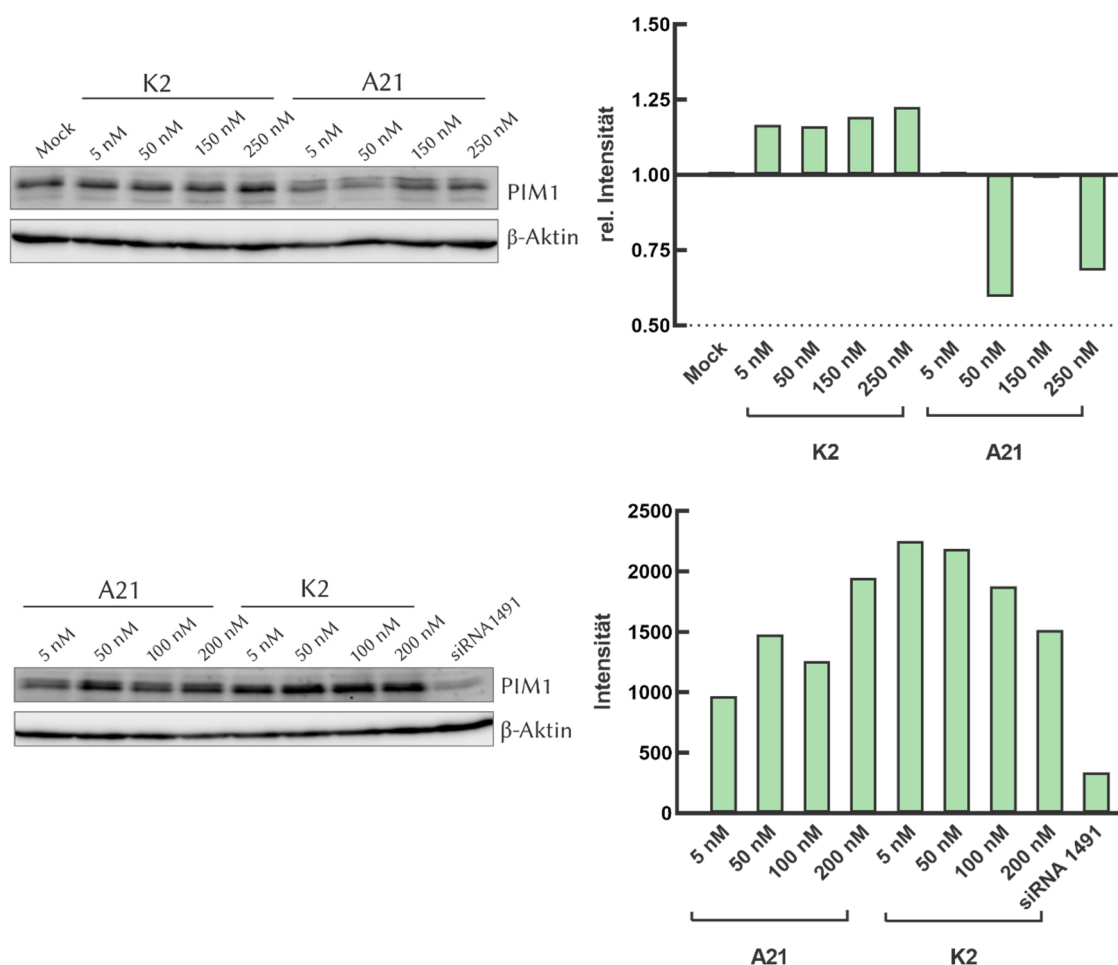


Abbildung 24: WB-Analyse von Adapter 21 Titrationsexperimenten in HeLa-Zellen

Detektion der PIM1- sowie β -Aktin-Expression mittels WB. Adapter A21 und die Kontrolle K2 sowie die Transfektionskontrolle siRNA1491 wurden in den jeweiligen Konzentrationen 48 Stunden zuvor mit LipofectamineTM3000 in HeLa-Zellen transfiziert. Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (rechte Graphen). Normalisiert wurde auf die Intensität der β -Aktin Banden sowie auf die Kontrolle Mock (unterer Graph).

3.1.7. DUAL-LUCIFERASE ASSAY IN HELA-ZELLEN

Um den Effekt des Adapter 21 mittels Dual-Luciferase Assay analysieren zu können, wurde ein psiCheckTM-2 Vektor verwendet, in welchem sich die 3'-UTR der *PIMI* mRNA nach dem Renilla Reporter gen befindet. Dadurch kann der Einfluss des Adapter 21 auf die *PIMI* mRNA mit Hilfe der Reportaktivität der Renilla Luciferase wiedergegeben werden. Die Klonierung dieses Vektors wurde von Manuela Harloff durchgeführt.

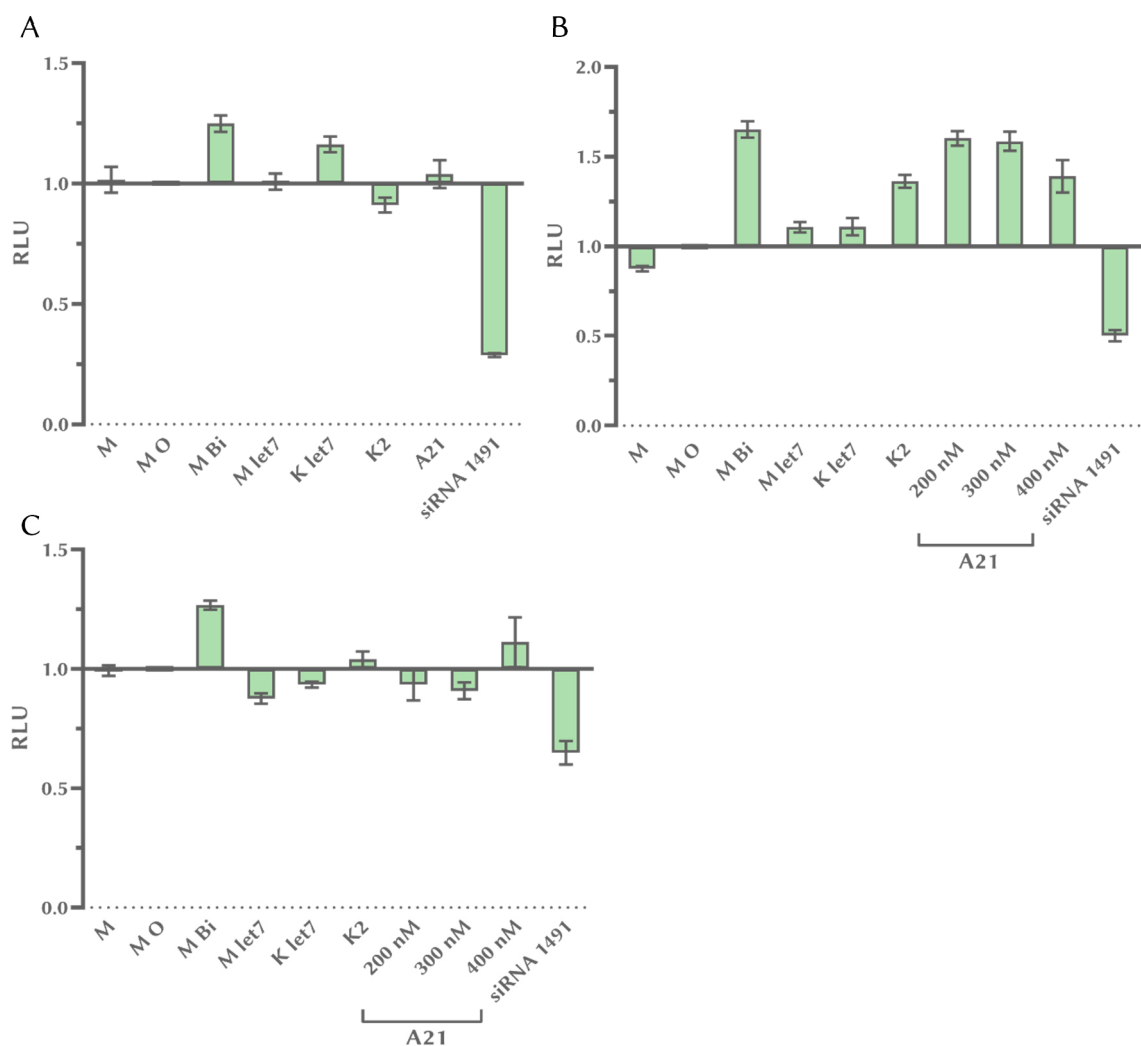


Abbildung 25: Dual-Luciferase Assay in HeLa-Zellen mit Adapter 21

Analyse der relativen Luciferase Units (RLU) in HeLa-Zellen. Diese wurden 48 Stunden zuvor mittels LipofectamineTM3000 mit der jeweiligen Konzentration des Adapter 21 (in A 200 nM) sowie weiteren Kontrollen transfiziert. Co-transfiziert wurde ebenfalls bei jeder Probe 1 µg psiCheckTM 2 Plasmid, welches die 3'-UTR der *PIMI* mRNA beinhaltet. Die Renilla Aktivität wurde anschließend im Tecan Safire bestimmt und mit Hilfe des Firefly Reporters sowie auf die RLU Werte der M O Probe normalisiert. Jedes analysierte Zelllysats wurde in vier technischen Replikaten vermessen.

In Abb. 25 sind die durchgeführten Luciferase Assay Ergebnisse dargestellt. Die Positivkontrolle siRNA1491 zeigt einen moderaten Effekt, der sich in jeder Wiederholung des Experimentes ein wenig vermindert. Die Konzentration des Adapters wurde in Experiment B und C bis auf 400 nM erhöht, da davon ausgegangen werden kann, dass ein Teil des Adapters auch an die endogene *PIM1* mRNA in den HeLa-Zellen bindet. Jedoch konnte kein Einfluss durch Adapter 21 in den drei Luciferase Experimenten beobachtet werden.

3.1.8. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

Im ersten Projekt dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob RISC-Komplexe an eine spezifische mRNA mit Hilfe eines bifunktionellen Adapter-Oligonukleotids umgeleitet werden können und so einen doppelten antitumorigenen Effekt auslösen. Der eingesetzte Adapter besitzt dabei zwei unterschiedliche Oligonukleotid-Sequenzen, welche durch einen Polyethylenglykol-Linker verbunden sind. Einer der beiden Adapter-Bereiche ist komplementär zur einer miRNA, wodurch RISC-Komplexe, welche mit dieser miRNA beladen sind, an den Adapter gebunden werden können. Der zweite Adapter-Bereich ist gegen eine spezifische mRNA gerichtet und ermöglicht es so, den gebundenen RISC Komplex zur gewünschten Target-mRNA umzuleiten. RISC-Komplexe können weitere Proteine rekrutieren, die die Deadenylierung und den Abbau der mRNA induzieren. Somit kann durch das Einsetzen des bifunktionellen Adapters nicht nur eine Funktionsinhibierung der gebundene miRNA stattfinden, sondern darüber hinaus die Translation der gebunden mRNA supprimiert werden.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des bifunktionellen Adapters die mRNA des Proto-Onkogens PIM1 adressiert sowie zu Beginn des Projektes die onkogene miR-20a, die die Proteinexpression des Zellzyklusregulators und Tumorsuppressors P21 herunterreguliert. Konzeptionell sollte also simultan ein synergistischer antitumorigener Effekt auf die onkogene miR-20a und die onkogene Kinase PIM1 erreicht werden.

Da eine Umleitung der RISC-Komplexe nur möglich ist, wenn das eingesetzte Oligonukleotid auch tatsächlich in der Lage ist, beladene RISC-Komplexe zu binden, wurden zuerst *in vitro* Pulldown-Experimente mit einem biotinylierten LNA Antisense-

Oligonukleotid durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit miR-20a beladene RISC-Komplexe aus K562 Zelllysaten isoliert werden können. Aufgrund dieser vielversprechenden Vorergebnisse wurden Zellkulturanalysen durchgeführt, in denen untersucht wurde, ob durch die genannten dualen, bifunktionellen Adapter-Oligonukleotide die Proteinexpression der PIM1-Kinase reprimiert und die von P21 dereprimiert werden kann. Dabei ist sicherlich das Mengenverhältnis der beiden adressierten Targets zueinander für einen deutlichen Adapter-Effekt wichtig. Da die *PIM1* mRNA Spiegel jedoch in K562-Zellen recht hoch sind, wurde die spezifische Adressierung von miR-20a auf die der gesamte miR-17 Familie (zu der miR-20a gehört) erweitert, um mehr beladene RISC-Komplexe binden zu können. Aus diesem Grund wurde innerhalb der ersten Testungen die LNA-Sequenz, welche gegen die miR-20a gerichtet ist, auf die Seed Sequenz der miR-17 Familie verkürzt. In Hinblick auf die PIM1-Expression konnte daraufhin bei einigen WB-Analysen in K562-Zellen eine moderate bis starke Herunterregulation der PIM1 Proteinspiegel beobachtet werden, die sich jedoch als instabil und damit nicht eindeutig reproduzierbar erwies. Des Weiteren wurden große Schwankungen bei der P21 Expression beobachtet, welche auch innerhalb der getesteten Negativkontrollen auftraten. Aufgrund dieser Schwankungen wurden die Untersuchungen zum Adapter-Effekt auf das P21-Protein beendet. Da weiterhin ein zu großes Ungleichgewicht zwischen der zellulären Expression der adressierten *PIM1* mRNA und der miR-17 Familie vermutet wurde, folgte eine weitere Adressierungsänderung hin zur stärker exprimierten let-7 Familie. Mit dem entsprechend veränderten Adapter konnten in weiteren WB-Analysen jedoch ebenfalls keine stabilen Effekte in K562-Zellen beobachtet werden. Um auszuschließen, dass dies an einer ineffizienten Transfektion liegt, wurde der bifunktionelle Adapter anschließend in HeLa-Zellen getestet, deren Transfektion sich im Vergleich zu K562-Zellen als effizienter und reproduzierbarer erwies. Hierbei konnte ein möglicher, von der RISC-Umleitung unabhängiger Effekt auf *PIM1* mRNA ausgeschlossen werden. Allerdings konnte weiterhin keine konstante Repression der PIM1 Kinase durch das Einsetzen des bifunktionellen Adapters beobachtet werden, was auch in durchgeführten Dual-Luciferase Assays nicht möglich war. Mögliche Gründe hierfür können sein:

1. Fehlende Vergleichbarkeit zur Positivkontrolle siRNA1491

Mit Hilfe der Positivkontrolle siRNA1491 konnte die Zugänglichkeit der Zielsequenz in der 3'-UTR der *PIMI* mRNA sowie eine stabile Transfektionseffizienz in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Die chemischen und mechanistischen Eigenschaften des bifunktionellen Adapters und der siRNA Positivkontrolle unterscheiden sich jedoch, weswegen sich das Einbringen des Adapters in die Zelle sowie die Bindung an die Target-mRNA unterscheiden können. Die Bindung ist zwar durch den Einbau von LNA-Nukleotiden in die Adaptersequenz begünstigt, es kann jedoch andererseits zu unspezifischen Bindungen an zelluläre Strukturen und Komponenten kommen. Dies ist ein generelles Problem, welches vor allem bei kurzen Oligonukleotiden auftreten kann und schwierig nachzuweisen ist. Des Weiteren können die endosomale Freisetzung sowie der intrazelluläre Transport des Adapter-Oligonukleotids anders sein als für die siRNA, was in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde. Darüber hinaus werden durch siRNA-programmierte, katalytisch wirksame RISC-Komplexe mehrere Kopien der gleichen mRNA hydrolisiert, was einen *Silencing* Effekt zur Folge hat, der in seiner Stärke jenen deutlich übertrifft, der durch das Umleiten eines RISC-Komplexes an die 3'-UTR einer mRNA erreichbar ist. Somit kann durch das Einsetzen der siRNA1491 eine generell funktionsfähige Transfektion bestätigt werden, jedoch lässt dies keinen Rückschluss auf ein erfolgreiches Binden des bifunktionellen Adapters und die Umleitung des RISC-Komplexes zu.

2. Interaktion zwischen Proto-Onkogen PIM1 und CDK-Inhibitor P21, Stressinduktion und Einfluss der miRNA-Familie

Für den beobachteten instabilen Derepressions-Effekt auf P21 gibt es mehrere mögliche Gründe.

Mit der verwendeten Positivkontrolle MiR LNA konnte die zuvor gezeigte starke Derepression des P21-Proteins durch Inhibition der miR-20a Funktion nicht reproduziert werden (Maren Thomas et al., 2012). In der Veröffentlichung von Thomas *et. al* konnte P21 nicht in unbehandelten K562-Zellen detektiert werden,

was hingegen in dieser Arbeit mit einem sensitiveren Antikörper der Firma *CellSignaling* möglich war. Die Hochregulation der Proteinexpression konnte daraufhin nicht mehr in der zuvor gezeigten Intensität reproduziert werden, was die Messung des Adapter-Effekts erschwerte.

Da sich innerhalb der 3'-UTR der *P21* mRNA mehrere Bindestellen befinden, an die die miRNAs der let-7 Familie binden können (Farberov et al., 2015; B. Liu et al., 2015), wurden auch nach dem Adressierungswechsel zur let-7 Familie weiterhin die P21 Protein-Spiegel untersucht. Es wurde hierbei jedoch keine vergleichbare Positivkontrolle eingesetzt, weswegen keine Aussage darüber getroffen werden kann, wie stark die P21-Derepression bei einem erfolgreichen Abfangen der let-7 miRNA Mitglieder ist. Um einen ausreichenden Einfluss bestimmen zu können, müsste eine Positivkontrolle verwendet werden, die nur gegen die Seed-Region der let-7 Familie gerichtet ist.

Neben einem zu schwachen Einfluss durch die miRNA-Familie könnte ebenfalls eine Interaktion zwischen PIM1 und P21 für die schwankende Expression verantwortlich sein. P21 kann von der PIM1-Kinase phosphoryliert werden, was einen stabilisierenden Effekt auf den CDK-Inhibitor P21 hat sowie dessen zelluläre Lokalisation beeinflusst (H. K. Kim et al., 2012; Zeping Wang et al., 2002; Y. Zhang et al., 2007). Vor allem der Stabilitätseinfluss könnte erklären, warum die P21 Spiegel simultan mit der PIM1-Proteinexpression sinken.

Für die auch in den Negativkontrollen beobachteten Schwankungen der P21 Spiegel könnte zellulärer Stress verantwortlich sein. Dieser wird möglicherweise durch die Transfektion der Zellen induziert, was die stark erhöhten P21-Mengen in der Leertransfektion erklären würde. Es wurde schon 1999 berichtet, dass P21 zum Schutz der Zelle bei verschiedensten Stressstimuli hochreguliert werden kann (Gorospe et al., 1999).

3. Dynamische Expression der PIM1-Kinase und Transfektions-bedingter Stresseinfluss

Wie bereits in dieser Arbeit erwähnt, weist PIM1 auf mRNA- und Proteinebene kurze Halbwertszeiten auf. Dadurch ergibt sich eine starke Dynamik, die die beobachteten instabilen Effekte erklären könnte. Neben der kurzen Halbwertszeit

des PIM1-Proteins ist ebenfalls bekannt, dass PIM1 durch verschiedene Stressinduktionen hoch- oder herunterreguliert werden kann (Iadevaia et al., 2010; Tu et al., 2011; S. Wang et al., 2017). Da das Einbringen von Fremd-DNA bzw. -RNA durch kationische Lipide eine zelluläre Stressantwort auslösen kann (Fischer-Kierzkowska et al., 2011), wären entsprechende Effekte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls denkbar. Ein möglicher Einfluss der Proteinstabilität wurde im Dual-Luciferase Assay untersucht, bei dem die Target-Sequenz des Adapter-Oligonukleotids in die 3'-UTR der Renilla Luciferase mRNA insertiert wurde. Im Gegensatz zu PIM1 besitzt das Renilla Luciferase Reporterprotein eine sehr viel höhere Halbwertszeit von 4,5 Stunden (Thorne et al., 2010). Es konnte jedoch auch hier keine Steigerung des Adapter-Effekts festgestellt werden, was die geringe Proteinstabilität von PIM1 als Hauptursache der geringen und instabilen Adapter-Effekte ausschließt und eher die kurze Halbwertszeit der *PIM1* mRNA Ebene als Ursache hinweisen könnte. Es ist bekannt, dass sich zwei AU-reiche Elemente (ARE) innerhalb der 3'-UTR der *PIM1* mRNA befinden, die die mRNA Stabilität stark beeinflussen. Bei einer Bindung des Proteins Tristetraprolin (TTP) an ein ARE wird die Stabilität der mRNA vermindert (H. K. Kim et al., 2012; Mahat et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass eine Bindung des Hu Antigens R (HuR) an ein ARE innerhalb der *PIM1* mRNA zu einer erhöhten Stabilität führt (Blanco et al., 2016). Je nach Expressionsstärke dieser regulatorischen Proteine variieren die PIM1 mRNA-Halbwertszeiten in verschiedenen Zelllinien stark und reichen von 35 min (Wingett et al., 1991) über 47 min in K562-Zellen (Meeker et al., 1990), bis hin zu 2,4 h in HeLa-Zellen (Mahat et al., 2012). Auch wenn sich die mRNA Halbwertszeiten in verschiedenen Zelltypen voneinander unterscheiden, so ist die Lebensdauer der *PIM1* mRNA in allen beschriebenen Zelllinien relativ kurz. Dies könnte bedeuten, dass der natürliche Abbau der *PIM1* mRNA schneller oder ähnlich schnell abläuft wie der induzierte Abbau durch die Umleitung des RISC-Komplexes und so ein Nachweis einer erfolgreichen Umleitung unter diesen Bedingungen schwierig ist.

4. Unterschiedliche Expression der Ziel-Moleküle

Die Arbeitsgruppe von Michael Göbel (Universität Frankfurt) konnte *in vitro* mittels Fluoreszenz-basierter Adapterbindungsexperiment zeigen, dass ein Verhältnis von miRNA, Adapter und mRNA-Target-Sequenz von 1:1:1 optimal für eine RISC-Komplex-Umleitung ist (Göbel et al., 2020). Da die Expressionsstärke der miR-17 Familie womöglich für dieses Verhältnis in K562-Zellen zu gering ist, wurde der Wechsel hin zur let-7 Familie vorgenommen, da letztere in K562-Zellen stärker expimiert wird als die miR-17 Familie (Vaz et al., 2010). Auch im später verwendeten HeLa-Zellsystem kann von einem hohen Expressions-Spiegel der let-7 miRNAs ausgegangen werden (Shell et al., 2007). Da es jedoch schwierig ist, die Stöchiometrie der zellulären *PIM1* mRNA und der gesamten miRNA Familie im Zytoplasma der Zellen einzuschätzen, kann keine abschließende Aussage darüber getroffen werden, ob das Vorkommen der adressierten Faktoren innerhalb der Zelle für die Testung des bifunktionellen Adapters optimal ist.

5. Einfluss der let-7 Familie auf die PIM1 Kinase

In den WB-Analysen konnte ein supprimierender Effekt der Kontrolle M let7, die nicht an die *PIM1* mRNA binden sollte, sondern nur die let-7 miRNA-Familie adressiert, auf die PIM1-Expression beobachtet werden. Dieser Effekt könnte durch ein unspezifisches Binden des M let7 Kontroll-Adapters an die *PIM1* mRNA zustande kommen sein (s. 5.2 Bindungsmöglichkeiten), oder indirekt durch die Inhibition der let-7 miRNA-Familie. Da die Co-Transfektion der M let7 Kontrolle zusammen mit dem Adapter 21 keinen additiven Einfluss auf die PIM1-Expression zeigte, ist eine sterische Blockade durch das unspezifische Binden des Kontroll-Adapters M let7 eher unwahrscheinlich, was jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden kann, da dies ebenfalls einen messbaren Adapter-Effekt voraussetzt.

Mit Hilfe der K let7 Kontrolle, die nur die Seed-Region der let-7 Familie adressiert und keinen zweiten Adapterbereich besitzt, konnte zudem ein kein indirekter Effekt auf die PIM1-Spiegel durch Blockierung der let-7 Familie

festgestellt werden. Da hier jedoch keine erfolgreiche Inhibition der let-7 miRNA Funktion nachgewiesen wurde, müssen weitere Untersuchungen mit einer validierten Kontrolle durchgeführt werden, um solch einen Einfluss tatsächlich ausschließen zu können. Von einer direkten Beeinflussung der PIM1 Kinase durch die let-7 Familie wurde bisher noch nicht berichtet. Es ist jedoch bekannt, dass einige let-7 Mitglieder die Expression und Aktivität der AKT Kinase beeinträchtigen können (Chirshv et al., 2019; Sun et al., 2016), welche mit einer Hochregulation von PIM1 in Verbindung gebracht wird (Muraski et al., 2007). Neben der AKT Kinase, wurde auch der Transkriptionsfaktor STAT3 als Target der let-7 Familie identifiziert (Yu Wang et al., 2010), der ebenfalls die Expression des PIM1-Gens stimuliert (Miura et al., 1994; Z. Wang et al., 2001). Dies könnte eine Spur zur Erklärung des instabilen Adapter-Effekts auf PIM1 sein, da es so über AKT und STAT3 zu einer Hochregulation von PIM1 kommen könnte, wenn die let-7 Familie in ihrer Funktion beeinträchtigt wird. Der negative Einfluss der M let7 Kontrolle lässt sich jedoch durch diesen möglichen indirekten Einfluss der let-7 Familie nicht erklären und bedarf weiterer Untersuchungen.

3.1.9. AUSBLICK

Die Arbeitsgruppe von Michael Göbel konnte kürzlich *in vitro* zeigen, dass nicht nur ein Einfangen von RISC-Komplexen mittels Pulldown-Experimenten möglich ist, sondern auch ein Umleiten an eine spezifische mRNA durchgeführt werden kann (Göbel et al., 2020). Dies unterstützt die Annahme, dass solch eine Umleitung ebenfalls im zellulären Umfeld möglich ist. Um diesen Effekt des bifunktionellen Adapters bestätigen zu können, sollten weitere Zellkultur-Analysen mit stabileren und möglichst gleich stark exprimierten Targets durchgeführt werden. Durch eine regulierbare Überexpression der adressierten mRNA und miRNA ließe sich möglicherweise ein gleich starkes Expressionsverhältnis innerhalb einer Zelllinie einstellen. Falls weiterhin die PIM1 Kinase als Target adressiert werden sollte, wäre eine Verwendung der Zelllinie SKOV3 möglich, in der nur geringe endogene *PIMI* mRNA-Spiegel vorhanden sind und kein PIM1 aus Proteinebene nachweisbar ist. Durch das Einbringen eines PIM1-kodierenden Plasmids, könnte die Stabilität und die Syntheserate der überexprimierten *PIMI* mRNA

eingestellt werden; zudem könnten Reporterfusionen mit der *PIMI* 3'-UTR konstruiert und analysiert werden. Für eine verlängerte Halbwertszeit und vergrößerte Stabilität wäre eine Deletion oder Mutation der destabilisierenden ARE-Elemente innerhalb der 3'-UTR denkbar. Eine verlängerte Halbwertszeit der *PIMI* mRNA konnte durch entsprechende Mutationen schon bestätigt werden. (H. K. Kim et al., 2012; Mahat et al., 2012). Auch eine direkte Inhibition von TTP wäre möglich, um die Induktion der Deadenylierung zu vermindern. Als Alternative zu einer Deletion der ARE-Elemente, könnten diese ebenfalls für eine Stabilisierung genutzt werden. Dies kann nicht nur durch eine Bindung des HuR-Proteins vermittelt werden (Blanco et al., 2016), sondern auch durch die Aktivierung des p38 MAP Kinase Signalwegs. Hierbei wird eine mRNA Stabilisierung durch Zytokine induziert (Soni et al., 2019; Winzen et al., 1999). Eine Blockierung der mRNA-Deadylierungsmaschinerie sollte ebenfalls zu einer verlängerten mRNA Halbwertszeit führen, jedoch könnten dadurch möglicherweise gewünschte Effekte der RISC-Umleitung ebenfalls blockiert werden.

Bei einer Untersuchung mit Hilfe von Reportergenen oder Fusionsgenen wäre eine Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Analyse denkbar, mit welcher die Annäherung des RISC-Komplexes an die *PIMI* mRNA direkt nachgewiesen werden könnte. Ein Nachweis von Protein-RNA Interaktionen in Zellen konnte mit dieser Methode schon gezeigt werden (Huranová et al., 2009). Allerdings könnte der Linker des bifunktionalen Adapters hierfür zu flexibel sein. Als alternative Methode zur WB-Analyse wäre auch eine Fluoreszenz Co-Detektion des direkt beeinflussten PIM1 und eines indirekt beeinträchtigten Proteins, wie z.B. P21, eine Option. Mit diesen Methodiken könnte es möglich sein, die Expression innerhalb der Zelle als „Momentaufnahme“ zu analysieren zu können, ohne die Zellen vorher lysieren zu müssen.

Im Hinblick auf den möglichen Einfluss der let-7 Familie auf die PIM1-Proteinexpression sollte ein validierter Inhibitor gegen diese miRNA-Familie getestet werden. Auch wenn die kurze LNA Kontrolle K let7 keinen Einfluss in dieser Arbeit gezeigt hat, kann der let-7 Einfluss nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da ein erfolgreiches Abfangen der let-7 miRNAs nicht überprüft wurde. Falls bei nachfolgenden Analysen ein Einfluss auf PIM1 durch die let-7 Familie bestätigt werden sollte, müsste weiter evaluiert werden, ob dieser für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, oder durch den Umleitungs-Effekt hervorgerufen wurden.

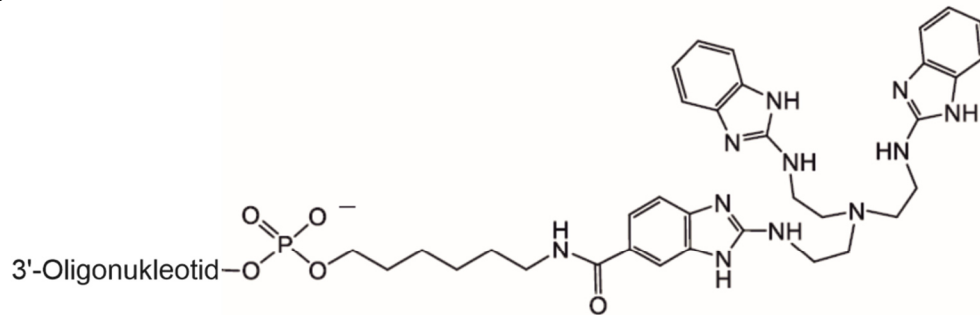
Des Weiteren sollten ergänzende Untersuchungen durchgeführt werden, die das erfolgreiche Einfangen der miRNAs im zellulären Milieu bestätigen. Dies kann mittels qPCR-Analyse überprüft werden, was als ergänzende Methode zum WB ebenfalls für die Bestimmung der *PIM1* mRNA-Spiegel durchgeführt werden sollte.

.

3.2. ANALYSE VON DNA/LNA KONJUGATEN MIT DER ARTIFIZIELLEN NUKLEASE TRIS(2-AMINOBENZIMIDAZOL)

Die Entwicklung von synthetischen Nukleasen, welche in der Lage sind RNA oder DNA Moleküle zu spalten, ist in den letzten Jahren immer weiter Vorangeschritten. Dabei unabhängig von endogenen Nukleasen zu sein und diese auch *in vitro* einsetzen zu können, macht artifizielle Nukleasen als gentechnisches Werkzeug sehr interessant. Die Arbeitsgruppe von Prof. Göbel berichtete schon 2005 von einer artifiziellen Ribonuklease (Tris(2-aminobenzimidazol)) (Scheffer et al., 2005), welche unabhängig von Metallionen spalten kann und sich dadurch nicht nur für die *in vitro* Verwendung eignet, sondern auch für einen möglichen therapeutischen Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass Oligonukleotid-Konjugate mit Tris(2-aminobenzimidazol) sequenzspezifisch RNA spalten (Gnaccarini et al., 2006), was mit einer Halbwertszeit von 10 bis 20 Stunden der Substrate einhergeht (Danneberg et al., 2015; Dogandziyski et al., 2015; Gnaccarini et al., 2006; Scheffer et al., 2005). Diese RNA-Substrate waren jedoch nicht länger als 29 Nukleotide lang, was zum Teil ein Vielfaches kürzer als endogen vorkommende RNAs ist. Um ausschließen zu können, dass längere und strukturiertere RNA-Targets die Aktivität von Tris(2-aminobenzimidazol) beeinflussen, wurden in dieser Arbeit RNA-Substrate von ca. 150 bis 400 Nukleotiden getestet. Dabei wurde die mRNA des Proto-Onkogens *PIMI* als Ziel RNA ausgewählt, welche schon in vorangegangenen Arbeiten und Antisense-Projekten in der Arbeitsgruppe Hartmann untersucht wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Bindestellen der miR-33a, sowie der siRNA1491 innerhalb der 3'-UTR der *PIMI* mRNA zugänglich sind (M. Thomas et al., 2012), woraufhin letzteres als Zielsequenz für das Oligonukleotid-Konjugat ausgewählt wurde. Somit sollte bei einer funktionalen Spaltaktivität des Nuklease-Konjugats eine verminderte PIM1 Expression zu beobachten sein (siehe Abb. 26). Die bisher getesteten Konjugate bestanden aus DNA- oder PNA-Nukleotiden. Da LNAs eine stabilere Bindung zur RNA aufweisen, resistenter gegen zellulären Abbau sind und sehr gut in Zellen eingebracht werden können, soll des Weiteren überprüft werden, ob ein verbessertes Resultat mit Hilfe von DNA/LNA-Mixmeren erlangt werden kann.

A



Konjugat 12: 3'-GTTGTAATGTTGAG-5' - Linker - 

B

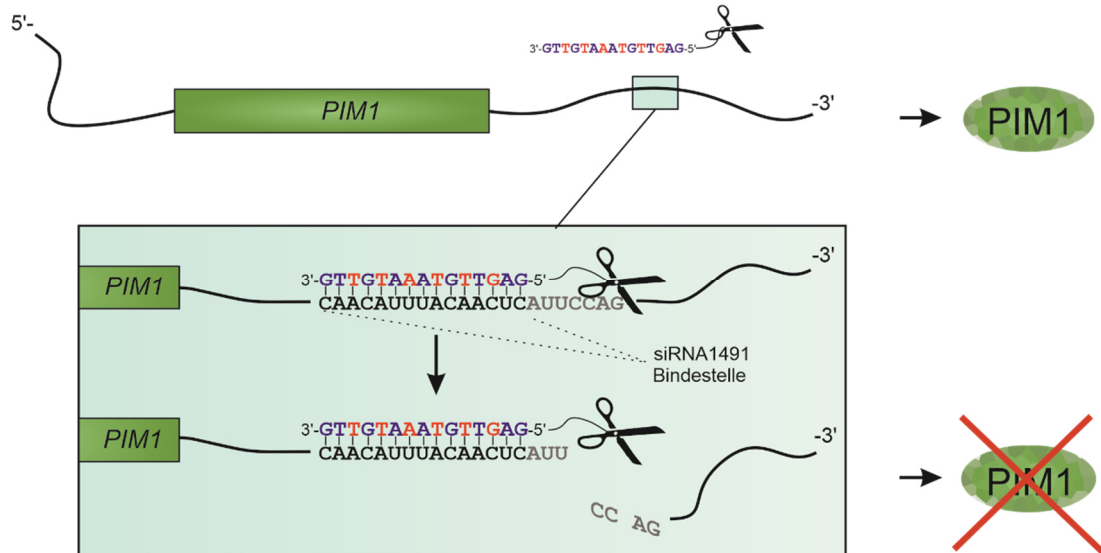


Abbildung 26: Tris(2-aminobenzimidazol) Konjugat

a) Darstellung des Tris(2-aminobenzimidazol) Moleküls sowie des Konjugat 12, welches die komplementäre Sequenz zur siRNA1491 Bindestelle enthält. In Blau sind DNA- und in Rot LNA-Nukleotide dargestellt. Der Linker besteht aus einem C₆-Aminolinker, welcher das 5'-Ende des Oligonukleotids mit der synthetischen Ribonuklease verbindet.

b) Schematische Darstellung der Wirkungsweise des Nuklease-Konjugats auf die *PIM1* mRNA

Um diese Arbeitshypothese untersuchen zu können, wurden zunächst die jeweiligen Oligonukleotide, bestehend aus DNA- und LNA-Nukleotiden, von der Arbeitsgruppe Göbel an Tris(2-aminobenzimidazol) konjugiert und auf ihre *in vitro* Aktivität mit Hilfe von fluoreszenz-markierten RNA-Substraten getestet (Zellmann et al. 2019 Abbildung 2). Um ausschließen zu können, dass die Fluoreszenzmarkierung einen Einfluss auf die

Spaltkinetik hat, wurden diese ebenfalls mit radioaktiv markierten RNA-Substraten in dieser Arbeit untersucht. Hierfür wurden zunächst geeignete Substrate ausgewählt, die anschließend mittels T7 Transkription synthetisiert wurden.

Die Faltung der RNA-Substrate wurde zunächst mit Hilfe des RNAfold Webservers (Kerpedjiev et al., 2015) bioinformatisch analysiert, um eine möglichst ähnliche RNA Faltung im Vergleich zur bioinformatisch vorhergesagten *PIM1* mRNA Faltung erhalten zu können (Abb. 27,28 und 29).

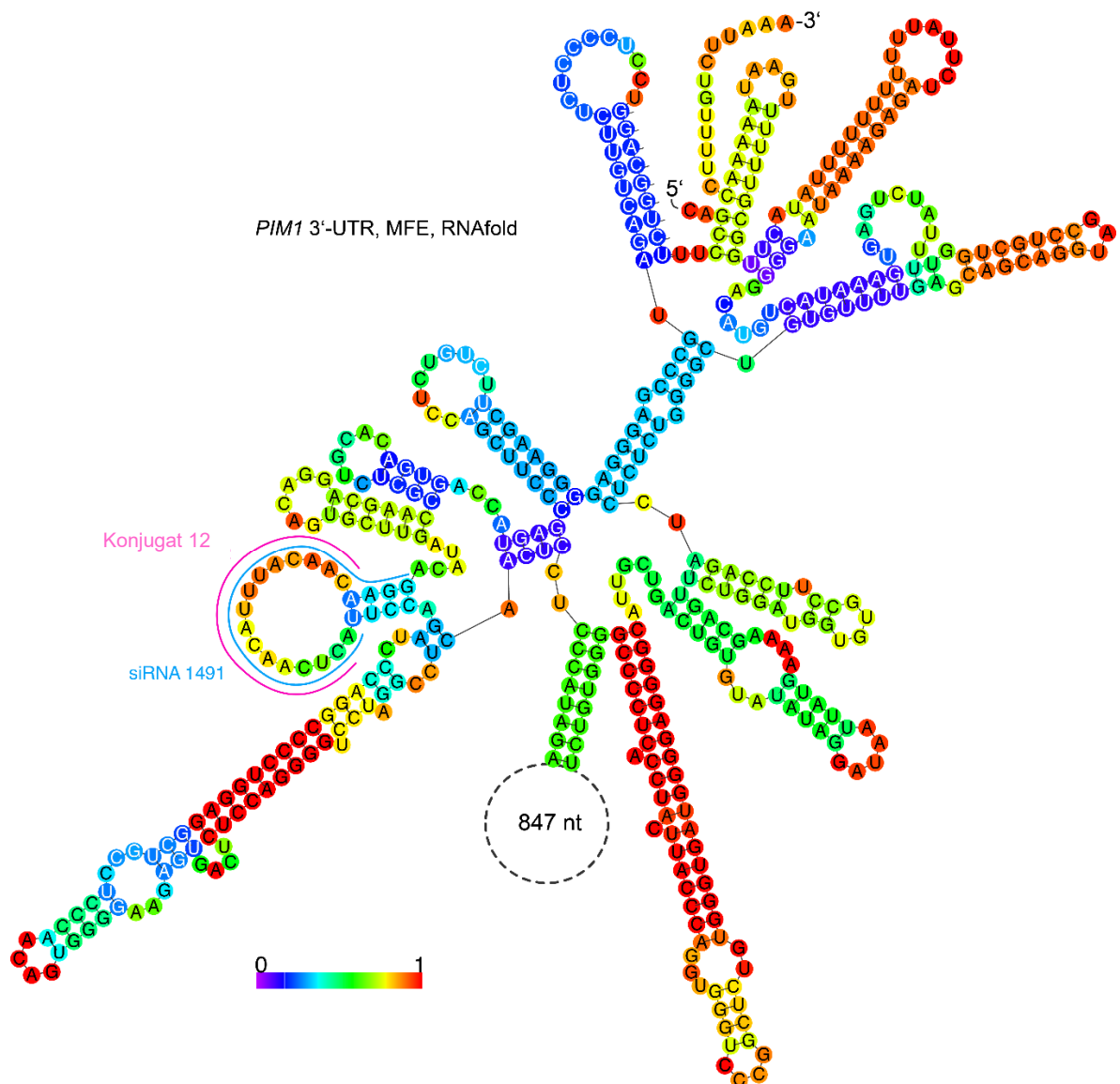


Abbildung 27: RNA Sekundärstruktur Vorhersage der *PIM1* 3'-UTR

RNAfold Vorhersage der Sekundärstruktur der *PIM1* 3'-UTR. Ein interner Bereich von 847 Nukleotiden wurde zur Übersicht weggelassen. Der angegebene Farbcode zeigt die Wahrscheinlichkeit der Bindung bzw. Nicht-Bindung eines Nukleotides an (Rot: hoch; Blau: gering). Die Bindestelle der siRNA1491 ist in Blau und die des Konjugat 12 in Pink dargestellt.

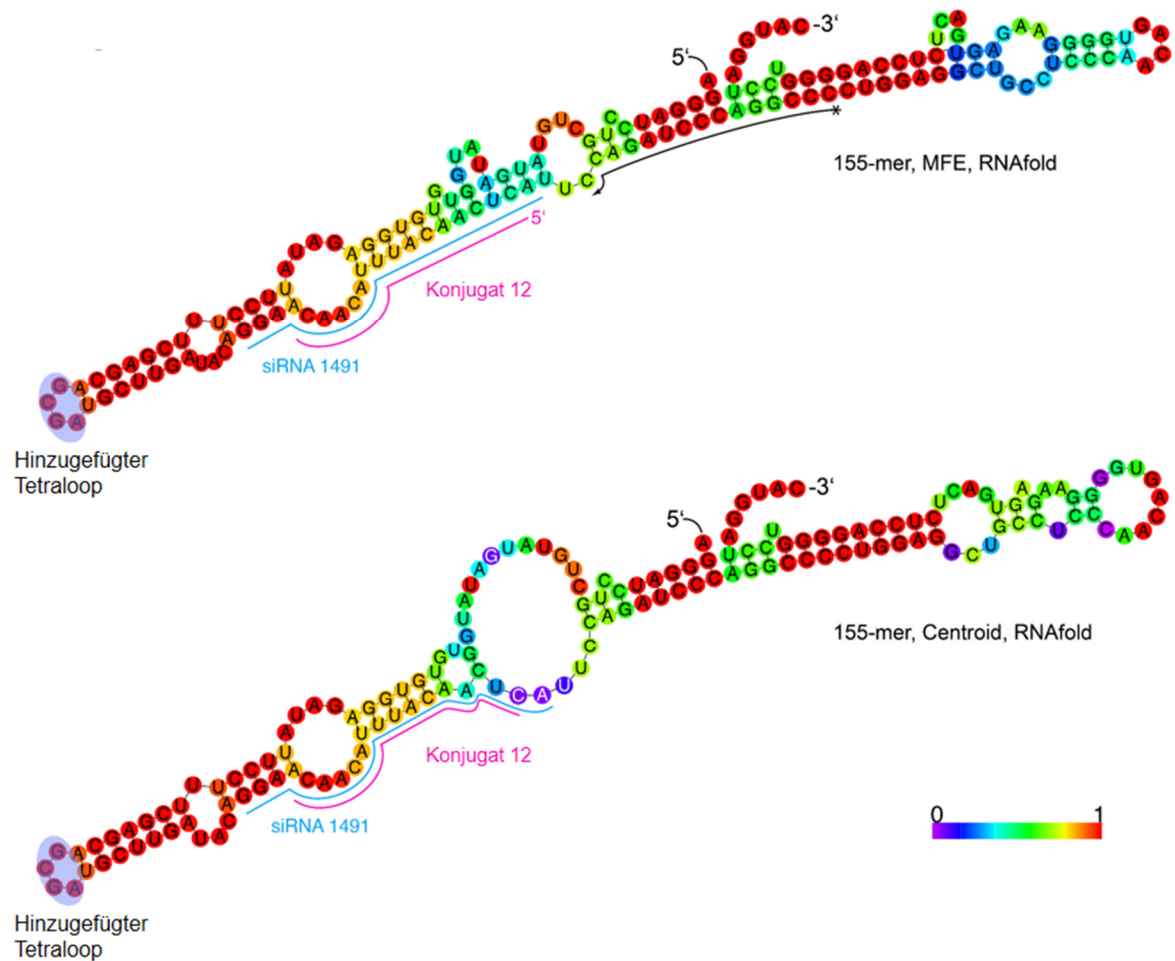


Abbildung 28: RNA Sekundärstruktur Vorhersage des 155-mer Substrats

RNAfold Vorhersage der Sekundärstruktur des 155-mer Substrats. Im oberen Bereich ist die minimale freie Energie (MFE) und im unteren die Centroid Struktur zu sehen. Der angegebene Farbcode zeigt die Wahrscheinlichkeit der Bindung bzw. Nicht-Bindung eines Nukleotides an (Rot: hoch; Blau: gering). Der hinzugefügte Tetraloop ist in Blau hinterlegt und der für das Primer Extension verwendete Primer als schwarzer Pfeil. Die Bindestelle der siRNA1491 ist in Blau und die des Konjugat 12 in Pink dargestellt.

Wie in Abb. 28 und Abb. 29 zu sehen ist, bleibt bei der Vorhersage der jeweiligen Substrat Struktur trotz einiger Faltungsunterschiede die siRNA1491 Bindestelle weiterhin zugänglich. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Faltung um die Bindestelle herum möglichst gering verändert wird und an den gleichen Bereichen flexibel bzw. stabil bleibt.

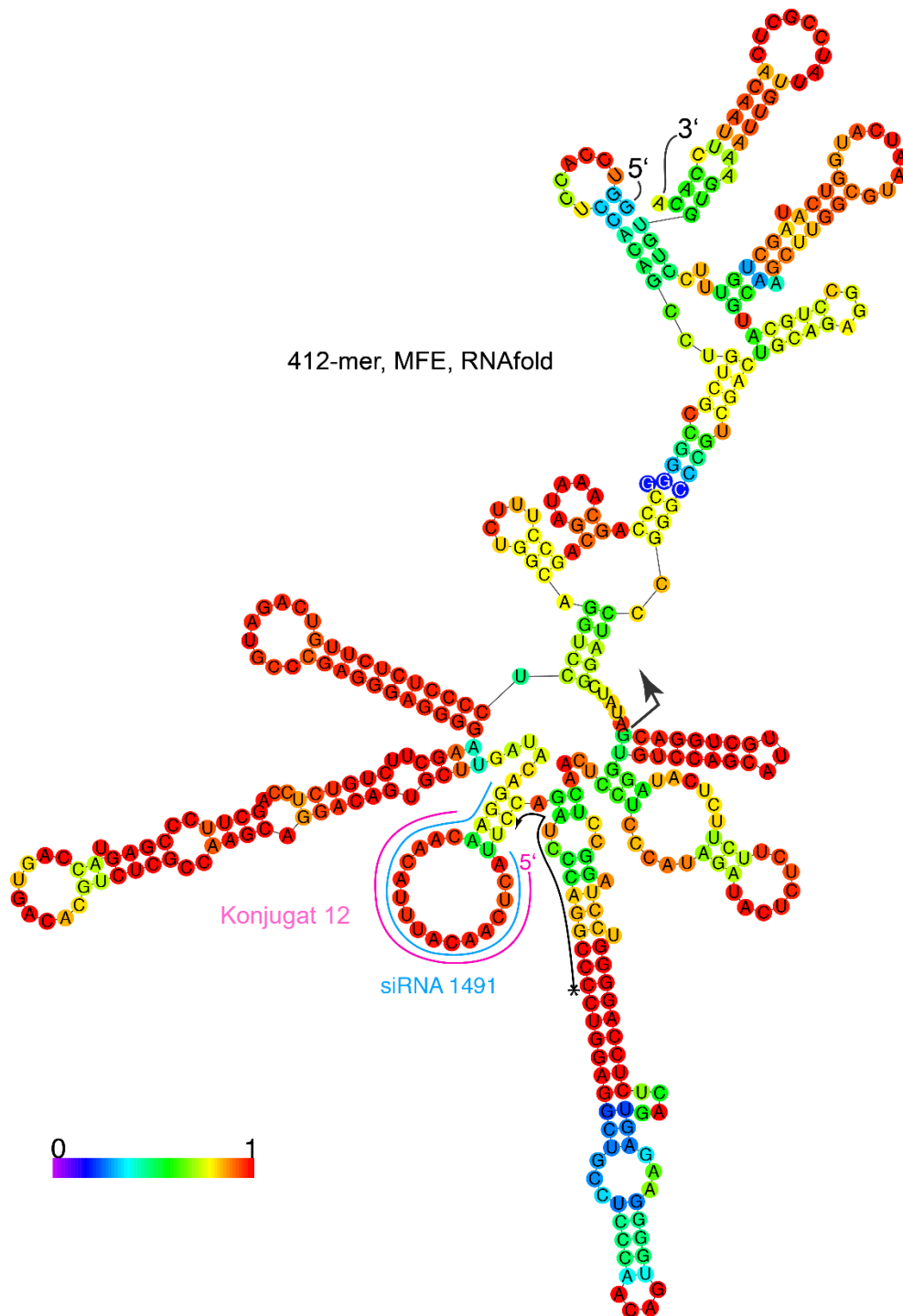


Abbildung 29: RNA Sekundärstruktur Vorhersage des 412-mer Substrats

RNAfold Vorhersage der MFE Sekundärstruktur des 412-mer Substrats. Der angegebene Farbcode zeigt die Wahrscheinlichkeit der Bindung bzw. Nicht-Bindung eines Nukleotides an (Rot: hoch; Blau: gering). Die Bindestelle der siRNA1491 ist in Blau und die des Konjugat 12 in Pink dargestellt.

3.2.1. HERSTELLUNG DES 155-MER SUBSTRATS

Um das 155-mer Substrat mit Hilfe einer T7-Transkription herstellen zu können, wurde zunächst die benötigte mRNA Sequenz in einen Puc19 Vektor kloniert. Dies wurde in zwei verschiedenen PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei durch die erste Reaktion ein Bereich von 493 nt der *PIMI* 3'-UTR mit beinhaltender siRNA1491 Bindestelle und der T7 Promotor in den Vektor eingefügt wurde. Um das so klonierte Insert weiter zu verkürzen, wurde in einer zweiten PCR-Reaktion mittels *site-directed Mutagenesis* ein Bereich von 318 nt deletiert und durch den Tetraloop GCGA ersetzt. Dadurch konnte eine im Experiment verwendbare Substratlänge erreicht werden, deren vorhergesagte Faltung um die siRNA1491-Bindestelle vergleichbar mit der vorhergesagten *PIMI* mRNA Faltung bleibt. Im Anschluss wurde das Puc19 Plasmid nach Hausprotokoll (10 mM DTT und 60 µg/mL Plasmid DNA) in einer T7 Transkription als Templat verwendet und vor einer weiteren Verwendung auf einem 10 % PAA Gel aufgetragen und überprüft, was in Abb. 30 zu sehen ist.

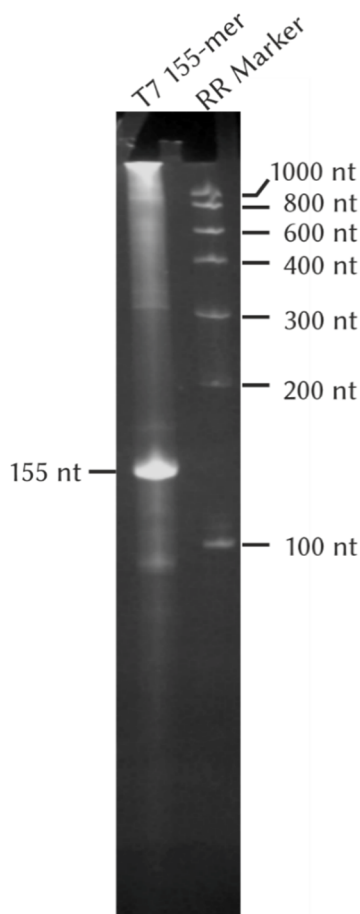


Abbildung 30: PAA Gel-Analyse des 155-mer T7 Transkription Produkts

10 % PAA Gel Analyse des 155-mer T7 Produkts sowie des *RiboRuler Low Range RNA* Markers. Das 155 nt lange Produkt ist auf einer Höhe zwischen der 200 und 100 nt Markerbande zu erkennen.

3.2.2. HERSTELLUNG DES 412-MER SUBSTRATS

Für das 412-mer Substrat wurde die Klonierungsstrategie sowie die darauffolgende PCR Reaktion in der Arbeitsgruppe Göbel durchgeführt, was in der Publikation Zellmann *et al.* 2019 nachzulesen ist. Da das verwendete PCR Produkt nicht als Templat für das Hausprotokoll der T7 Transkription eingesetzt werden konnte, wurde hier das *NEB HiScribeT7 High Yield RNA Synthesis* Kit nach Herstellerangaben verwendet. Das so hergestellte T7 Produkt wurde ebenfalls auf einem 7 % PAA Gel vor einer weiteren Verwendung überprüft und aufgereinigt (Abb. 31).

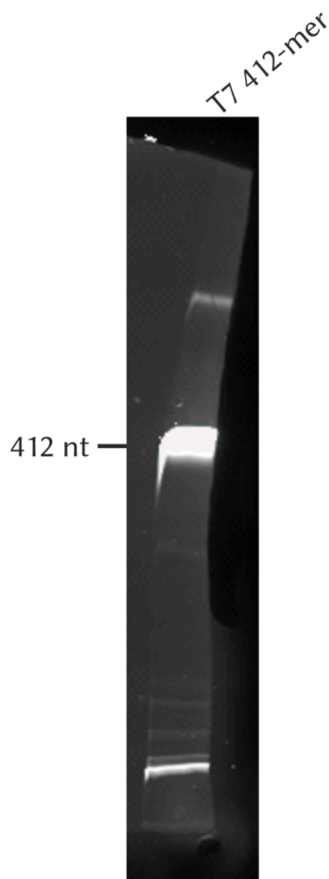


Abbildung 31: PAA Gel-Analyse des 412-mer T7 Transkription Produkts

7 % PAA Gel Analyse mit starker Bande auf der erwarteten Höhe des 412-mer T7 Produkts

3.2.3. SPALTKINETIKEN

Um eine Spaltaktivität des Konjugat 12 nachweisen zu können, wurden beide RNA-Substrate an ihrem 5'-Ende radioaktiv mit [^{32}P] markiert und im Anschluss Spaltkinetiken mit den so markierten RNA-Substraten durchgeführt.

Bei der Gelanalyse der RNA-Substrate, welche zuvor mit Konjugat 12 inkubiert wurden, konnte in beiden Fällen ein spezifisches Spaltprodukt identifiziert werden, wie in Abb. 32 zu sehen ist. Das Spaltprodukt ist bei beiden Substraten nach 1 Stunde nachweisbar und nach 16 Stunden sind ca. 75 % des jeweiligen RNA-Substrats gespalten. Um eine Kontamination der RNA Proben durch RNasen auszuschließen zu können, wurde das 155-mer oder 412-mer Substrat für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert, jedoch kein Spalter Konjugat hinzugegeben. Des Weiteren wurde eine zweite Negativkontrolle getestet, bei welcher ein unspezifisches Konjugat mit dem jeweiligen Substrat inkubiert wurde. Hierbei handelt es sich um das Konjugat 16, an welches eine unspezifische Sequenz konjugiert ist, die keine Komplementarität zur *PIMI* mRNA aufweist. Bei allen aufgetragenen Negativkontrollen sind keine Spalt- oder Degradationsprodukte erkennbar. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Spaltprodukten mit Konjugat 12 um unspezifische Spaltung oder Degradationsprodukte durch Kontamination mit RNasen handelt.

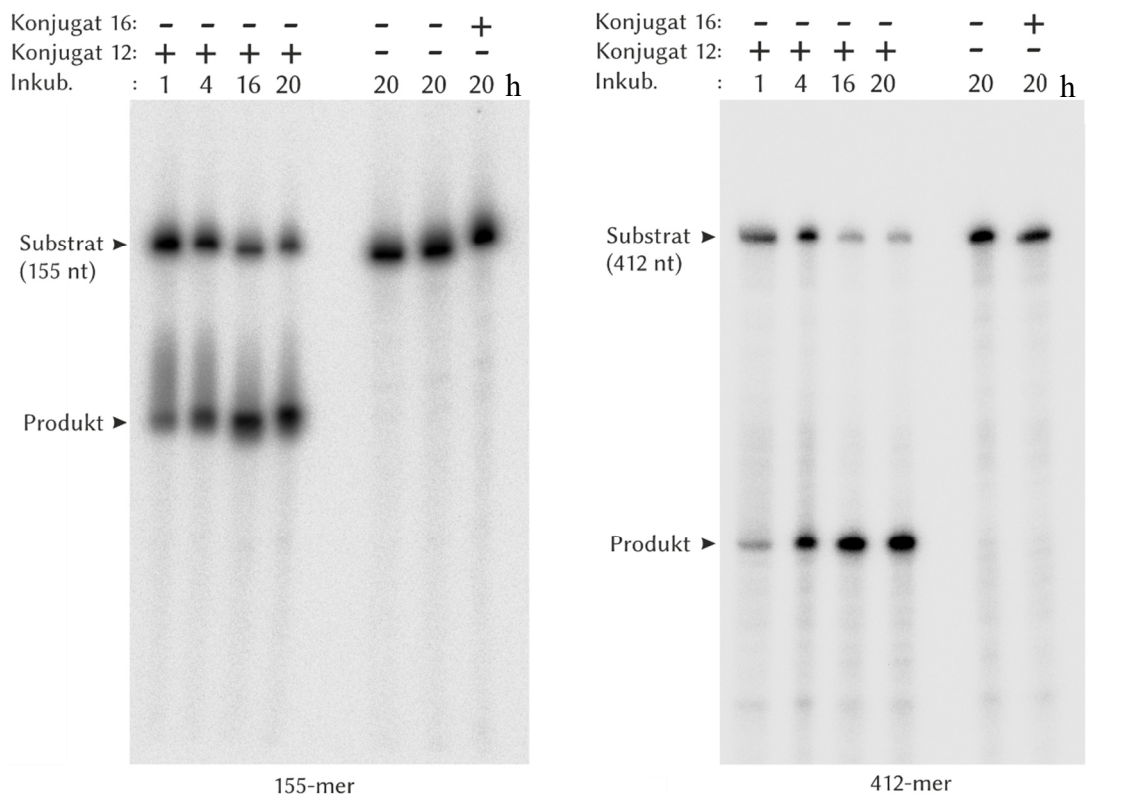


Abbildung 32: PAA Gel-Analyse der 155-mer und 412-mer Spaltassays mit Konjugat 12

PAA Gel Analyse der Spaltkinetik des 155-mer (links) und 412-mer (rechts) RNA Substrats durch Nuklease Konjugat 12. Die Inkubation wurde bei 37 °C in 50 mM Tris-Puffer (pH 8) durchgeführt und Proben nach 1, 4, 16 und 20 Stunden gezogen. Es wurden jeweils ca. 24 nM radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt, sowie 300 nM (bei 155-mer) und 200 nM (bei 412-mer) des Nuklease Konjugat 12. Als Kontrolle wurde die radioaktiv markierte RNA ohne Konjugat oder mit dem nicht-komplementären Konjugat 16 für 20 Stunden inkubiert.

Um eine Aussage über die Spaltungseffizienz von Konjugat 12 treffen zu können, wurden die Spaltassays bei verschiedenen Konjugat Konzentrationen wiederholt. Mit Hilfe des *Phosphorimager* Geräts und der *AIDA Image Analysis* Software wurden die Spaltungsassays ausgewertet und weiter in der Software GraFit analysiert. Das 155-mer Substrat zeigt bei einer Inkubation mit 250 nM des Konjugats 12 eine Halbwertszeit von ca. 2-3 Stunden und nach 20 Stunden sind ca. 75 % des RNA Substrats gespalten, wie in Abbildung 33 zu sehen ist. Die maximale Geschwindigkeitskonstante k_{\max} liegt bei dem 155-mer Substrat bei $0,36 \text{ h}^{-1}$ (Abbildung 33 b).

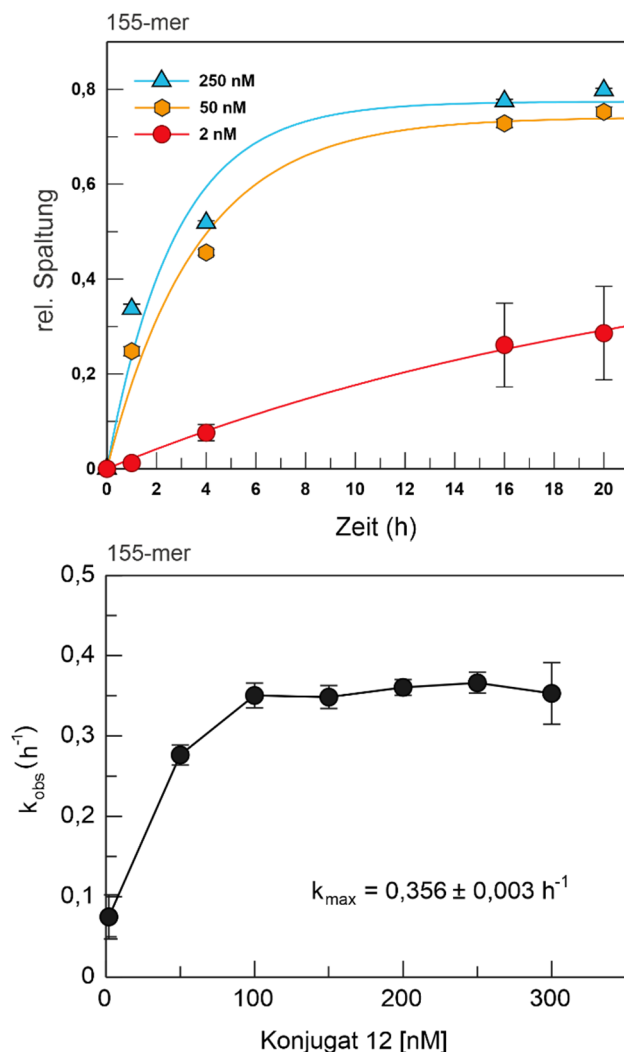


Abbildung 33: Spaltkinetik des 155-mer Substrats

a) Zeitverlaufskurve der Spaltung des 155-mer Substrats durch 2 nM, 50 nM und 250 nM des Konjugat 12. Pro Konzentration wurden jeweils 4 Experimente durchgeführt.

b) Auftragung der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} als Funktion der eingesetzten Konzentrationen von Konjugat 12. Es wurde keine Kurvenanpassung durchgeführt, sondern die Punkte nur verbunden. Bei beiden Graphen wurden die Fehlerbalken als Standardabweichung des Mittelwerts berechnet.

Mit dem 412-mer Substrat konnten ähnliche Werte bei der Spaltung ermittelt werden, wie in Abb. 34 zu sehen ist. Hierbei wurde das Substrat ebenfalls zu ca. 75 % nach 20 Stunden Inkubation umgesetzt. Die Halbwertszeit steigt leicht im Vergleich zum 155-mer und liegt bei ca. 4 Stunden. Die maximale Geschwindigkeitskonstante k_{max} ist ebenfalls vergleichbar und beträgt 0,27 h⁻¹. Somit scheint die Substratlänge sowie Struktur und Faltung keinen großen Einfluss auf die Effizienz der Spaltung durch Konjugat 12 zu haben. Lediglich die Halbwertszeit steigt bei dem längeren Substrat etwas, was allerdings mit der stöchiometrischen Wahrscheinlichkeit der Bindung an die passende Sequenz begründet werden kann, da das 412-mer eine 2,6-fach längere Sequenz im Vergleich zum 155-mer aufweist.

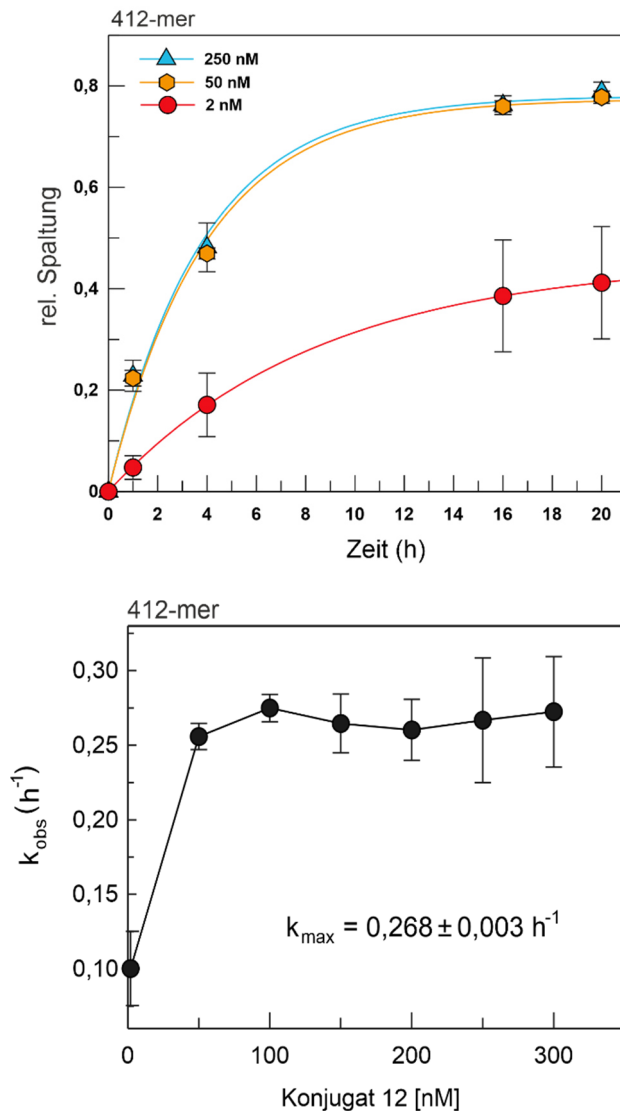


Abbildung 34: Spaltkinetik des 412-mer Substrats

a) Zeitverlaufskurve der Spaltung des 412-mer Substrats durch 2 nM, 50 nM und 250 nM des Konjugat 12. Pro Konzentration wurden jeweils 4 Experimente durchgeführt.

b) Auftragung der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} als Funktion der eingesetzten Konzentrationen von Konjugat 12. Es wurde keine Kurvenanpassung durchgeführt, sondern die Punkte nur verbunden. Bei beiden Graphen wurden die Fehlerbalken als Standardabweichung des Mittelwerts ausgerechnet.

Bei den vorangegangenen Untersuchungen im Arbeitskreis Göbel wurden DNA- oder PNA-Konjugate bei den durchgeführten Spaltkinetiken verwendet. Mit diesen konnten Halbwertszeiten von 10 bis 20 Stunden der verwendeten RNA-Substrate ermittelt werden (Danneberg et al., 2015; Dogandzhiyski et al., 2015; Gnaccarini et al., 2006; Scheffer et al., 2005). Bei den in dieser Arbeit eingesetzten LNA/DNA-Mixmeren konnte eine deutlich verbesserte Spaltkinetik festgestellt werden, bei welcher die Halbwertszeit auf 3 bis 4 Stunden verkürzt werden konnte. Des Weiteren fand dies trotz eines teilweise deutlich verlängerten und strukturierten RNA-Substrates statt. Es ist bekannt, dass das Bindungsverhalten von LNA-Nukleotiden zur RNA um einiges stabiler ist als bei DNA-Nukleotiden. Des Weiteren wird der so entstandene Duplex stärker stabilisiert und es kommt zu einer leichten Veränderung der RNA Helix Struktur (Owczarzy et al., 2011).

Die so verbesserte Stabilität der Bindung von DNA/LNA zur Ziel-RNA könnte die verbesserte Spaltkinetik erklären.

3.2.4. IDENTIFIKATION DER SPALTPOSITION

Um die genaue Spaltposition der RNA Substrate identifizieren zu können, wurde ein Primer-Extension Experiment durchgeführt. Hierfür wurde zuerst eine Spaltung der unmarkierten RNA-Substrate durchgeführt und im Anschluss diese mit einem radioaktiv markierten Primer inkubiert, mit welchem eine reverse Transkription durchgeführt werden konnte. Bei der reversen Transkription wurden als Kontrolle unterschiedliche Kombinationen an Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) hinzugegeben, sowie ungespaltene RNA-Substrate verwendet.

Wie in den gezeigten Gelbildern in Abb. 35 zu sehen ist, sind mehrere Primer Extension Produkte des radioaktiv markierten RT Primers entstanden. In den Gelbahnen 3 und 12 wurde als Kontrolle jeweils nur Desoxyadenosin (dA) als Nukleotid für die reverse Transkription eingesetzt. Bei einer Verlängerung des RT Primers sollte bei der Zugabe von ausschließlich dA Nukleotiden eine einzelne Bande bei +2 erscheinen, da die Sequenz der mRNA anschließend ein Thymidin (T) vorgibt. Die +2 Bande ist deutlich zu erkennen, wobei ebenfalls eine +3 Bande zu sehen ist, welche stark im 155-mer Gel, aber auch beim 412-mer Substrat vorkommt. Dies lässt vermuten, dass die reverse Transkriptase durch den Überschuss an dA ein zusätzliches Nukleotid einbaut, auch wenn dies nicht der Templatsequenz entspricht. Bei einer Zugabe von dA und dT entsteht eine spezifische Bande bei + 3 (Gelbahn 4 und 13) und keine weiteren unspezifischen Banden sind zu sehen. Bei den Negativkontrollen (Gelbahn 1-2 und 10-11) wurde RNA-Substrat verwendet, welches nicht mit Konjugat 12 inkubiert wurde. Hierbei ist ein deutlicher Längenunterschied der Primer Extension Produkte im Vergleich zu den Proben, die durch Konjugat 12 gespalten wurden, erkennbar. Dies zeigt, dass die Banden im oberen Gelbereich durch ungespaltete RNA-Substrate zustande kommen, was mit einer Spalteffizienz von rund 75 % erklärbar ist (siehe Abb. 33 und 34). Da sich das Spaltmuster der Kontrollproben deutlich von den mit Konjugat 12 inkubierten Proben unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass bei den Spaltprodukten eine spezifische

Verlängerung des RT Primers stattfindet, was eine genaue Identifizierung der Spaltstelle ermöglicht.

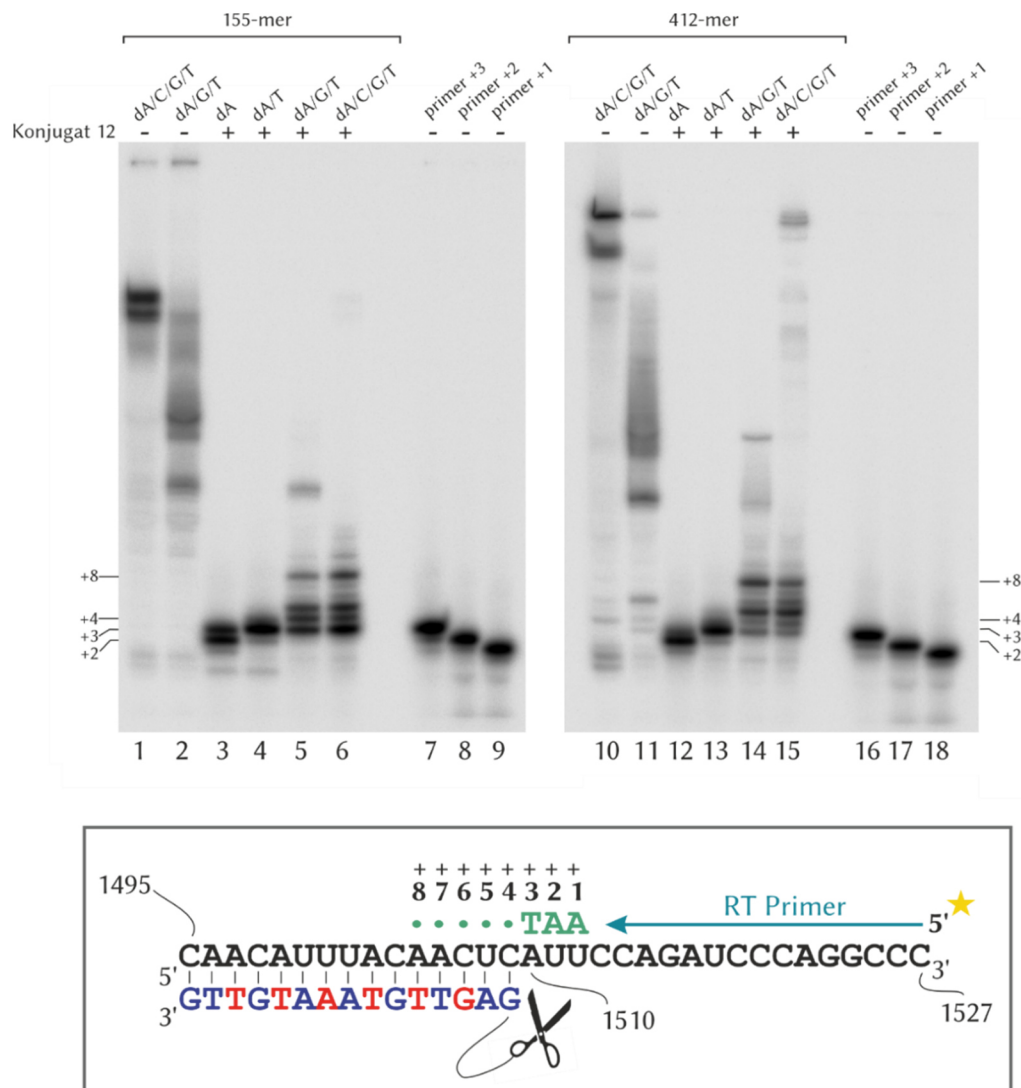


Abbildung 35: Primer-Extension Experiment mit 155-mer und 412-mer Substrat

Die reverse Transkription des Spaltprodukts von 155-mer (links) und 412-mer (rechts) wurde mit unterschiedlichen Kombinationen von dNTPs durchgeführt. In Gelbahn 3 und 12 nur mit dA; in 4 und 13 mit dA/T; in 5 und 14 mit dA/G/T und in 6 und 15 mit allen dNTPs. In den Kontrollproben wurden entweder alle dNTPs verwendet (Bahn 1 und 10, sowie alle Primer Kontrollen), oder dA/G/T (Bahn 2 und 11) hinzugegeben. Die 5'-³²P markierten Primer +1, +2 und +3 imitieren die Extensionsprodukte des RT Primers von bis zu 3 Nukleotiden. Im unteren Bildbereich ist schematisch die Zielsequenz der siRNA1491 Bindestelle dargestellt mit gebundenem Konjugat 12, sowie des 5'-³²P markierten RT Primers.

Bei den Hauptproben, welche in der Gelbahn 6 wie auch 15 zu sehen sind, wurden alle Nukleotide bei der reversen Transkription hinzugegeben. Hierbei zeigt sich ein Bandenmuster bei +3, +4, +5 und +8 Nukleotiden, welches sich in der Intensität leicht bei beiden eingesetzten RNA-Substraten unterscheidet. Bei Substrat 155-mer tritt eine

recht gleichmäßige Verteilung der Spaltprodukte auf und es ist nur eine etwas stärkere +3 Bande identifizierbar; wohingegen das 412-mer Substrat stärker an Position +4 und +8 gespalten wird. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass bei beiden RNA-Substraten eine Spaltung direkt nach der Bindung des DNA/LNA Mixmers zustande kommt, welche bis 5 Nukleotide innerhalb der Bindung der *PIMI* mRNA und des Konjugat-Oligonukleotids auftritt.

Die durchgeführten Spaltkinetiken sowie Primer-Extension Experimente zeigen, dass das DNA/LNA Mixmer-Konjugat 12 RNA-Substrate spezifisch wie auch sehr effizient spaltet. Dabei hat die vergrößerte Länge sowie Komplexität des jeweiligen RNA-Substrates keinen Einfluss auf die Spaltkinetik, was im Hinblick auf einen zellulären Einsatz des Konjugats sehr positiv bewertet werden kann. Des Weiteren konnte die Halbwertszeit der Substrate durch den Wechsel von DNA- bzw. PNA-Oligonukleotiden zu DNA/LNA-Mixmeren auf 3-4 Stunden herabgesetzt werden, wobei das Konjugat 12 mit einem ungefähr 10-fachen Überschuss gegenüber des RNA-Substrats eingesetzt wurde.

3.2.5. ZELLKULTUR ANALYSEN

Um untersuchen zu können, ob das Konjugat 12 die *PIM1* mRNA auch im zellulären Umfeld spalten kann, wurde dieses sowie mehrere Kontrollen zunächst in K562-Zellen transfiziert. Im Anschluss wurde die Proteinexpression von PIM1 mittels WB untersucht und ausgewertet.

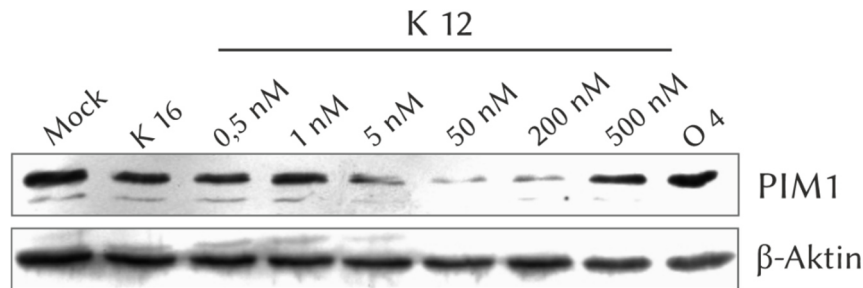


Abbildung 36: WB-Analyse nach Transfektion mit Konjugat 12 in K562-Zellen

WB Analyse der PIM1- (oben) sowie β -Aktin-Expression (unten). Das Konjugat 12 wurde 72 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit LipofectamineTM2000 in K562-Zellen transfiziert, sowie das unspezifische Konjugat 16 (K 16) und das Antisense-Oligonukleotid 4 (O 4). Als weitere Kontrolle wurde ein unbehandeltes Zelllysate aufgetragen (Mock). Die Antikörperdetektion wurde mit Röntgenfilmen durchgeführt.

Die PIM1 Expression verringert sich deutlich ab einer Transfektion von 5 nM des Konjugat 12 und wird bei einer Konzentration von 50 nM sowie 200 nM nochmals geringer (Abb. 36). Ab einer Konzentration von 500 nM steigt die Expression von PIM1 wieder an, ist jedoch immer noch schwächer als im Vergleich zu den Negativkontrollen K 16 und O 4. Da das unspezifische Konjugat 16 keinen Einfluss auf die PIM1 Expression hat, kann ausgeschlossen werden, dass ein unspezifischer Effekt durch Tris(2-aminobenzimidazol) in den K562-Zellen zustande kommt. Oligonukleotid 4 besitzt die gleiche Sequenz und chemischen Eigenschaften wie das Oligonukleotid des Konjugat 12. Hierdurch wird kontrolliert, ob der Effekt auf die PIM1 Expression durch einen Antisense-Effekt vermittelt wird, der durch die Bindung des Mixmers an die *PIM1* mRNA entstehen kann. Da in beiden Kontrollen kein Effekt auf die PIM1 Expression zu erkennen ist, scheint eine spezifische Spaltaktivität bei einer Konzentration von 5-500 nM des Konjugat 12 vorhanden zu sein.

Um dies weiter bestätigen zu können, wurde die WB-Analyse wiederholt und die siRNA1491 Positivkontrolle hinzugefügt. Hierdurch kann kontrolliert werden, ob die Transfektion in K562-Zellen erfolgreich und effizient durchgeführt wurde. Um eine flexiblere Detektion zu ermöglichen wurde in den folgenden WB-Analysen von der Röntgenfilmdetektion zur Detektion in der ChemiDoc Anlage gewechselt.

Wie in Abb. 37 zu sehen ist, konnte auch bei einem Wiederholungsexperiment ein Effekt durch Konjugat 12 mit den Konzentrationen von 20 und 100 nM auf die PIM1 Expression beobachtet werden. Dieser ist jedoch nicht mehr bei einer höheren Konzentration von 200 nM oder 500 nM festzustellen. Im Gegensatz zur transfizierten Positivkontrolle siRNA1491, zeigen die beiden Negativkontrollen K 16 und O 4 weiterhin keinen Effekt auf die PIM1 Expression. Jedoch ist der Einfluss durch die siRNA1491 nicht so stark wie vermutet, was auf eine moderate Transfektionseffizienz zurückzuführen ist. Des Weiteren ist eine verringerte Expression in der L Kontrolle zu beobachten, wenn diese mit der K 16 oder O 4 Kontrolle verglichen wird. Dies könnte durch toxische Nebenwirkungen durch eine Leertransfektion auftreten, da hier das LipofectamineTM2000 nicht wie in den anderen Proben ein Oligonukleotid verpacken kann. Dass LipofectamineTM2000 einen Einfluss auf die Zellproliferation und Lebensfähigkeit haben kann, wurde schon zuvor berichtet (Arbab et al., 2004) und zeigte sich auch im ersten RISC-Umleitungs Projekt.

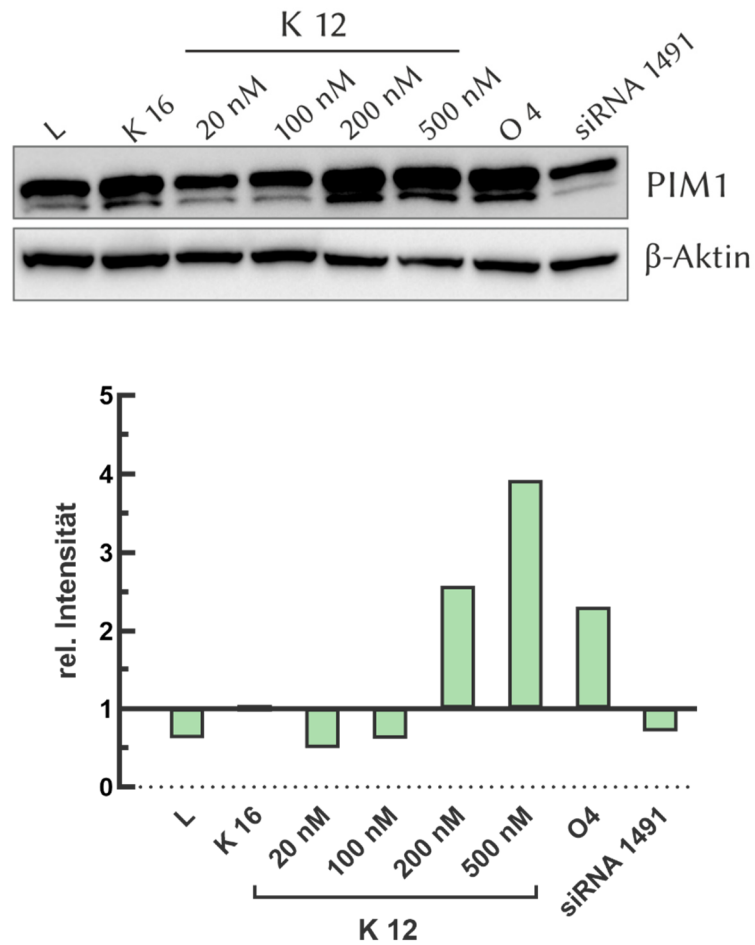


Abbildung 37: Wiederholung der WB-Analyse nach Transfektion mit Konjugat 12 in K562-Zellen

Western Blot Analyse der PIM1- (oben) sowie β -Aktin-Expression (unten). Das Konjugat 12 wurde 72 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit Lipofectamine™2000 in K562-Zellen transfiziert, sowie das unspezifische Konjugat 16 (K 16) und das Antisense-Oligonukleotid 4 (O 4). Als weitere Kontrolle wurde die Transfektionskontrolle siRNA1491 (80 nM) und eine Leertransfektion (L) aufgetragen. Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (unterer Graph). Normalisiert wurde auf die Intensität der β -Aktin Banden sowie auf Kontrolle K 16.

Durch die Verwendung der siRNA1491 Positivkontrolle konnte beobachtet werden, dass die Transfektionseffizienz der Suspensionszelllinie K562 bei diesem Experiment für eine Interpretation der Ergebnisse nicht ausreicht. Aus diesem Grund wurden weitere Wiederholungen durchgeführt, um stabilere Transfektionsdaten in dieser Zelllinie zu generieren. Wie in Abb. 38 zu sehen ist, konnte jedoch trotz verbesserter Transfektionseffizienz kein repressiver Effekt auf die PIM1 Expression durch Konjugat 12 reproduziert werden.

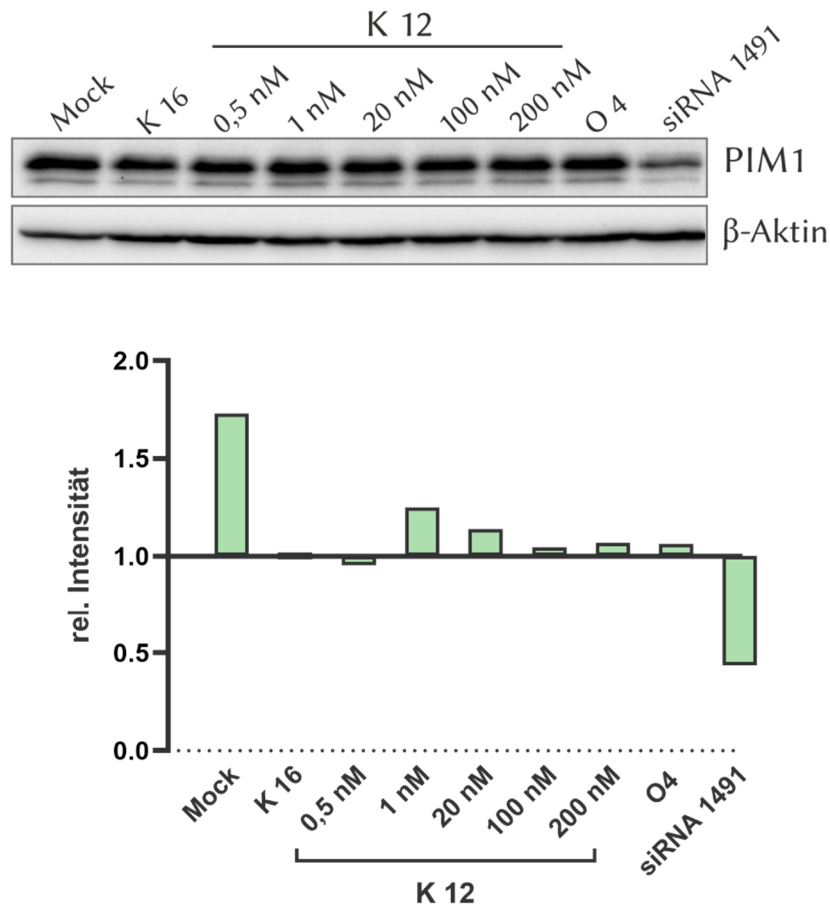


Abbildung 38: Zweite Wiederholung der WB-Analyse nach Transfektion mit Konjugat 12 in K562-Zellen

Western Blot Analyse der PIM1- (oben) sowie β -Aktin-Expression (unten). Das Konjugat 12 wurde zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit LipofectamineTM2000 in K562-Zellen transfiziert, sowie 200 nM des unspezifischen Konjugat 16 (K 16) und Antisense-Oligonukleotid 4 (O 4). Als weitere Kontrolle wurde die Transfektionskontrolle siRNA1491 (80 nM) und ein unbehandeltes Zelllysate aufgetragen (Mock). Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (unterer Graph). Normalisiert wurde auf die Intensität der β -Aktin Banden sowie auf Kontrolle K 16.

3.2.5.1. ANALYSE DES NUKLEASE-KONJUGATS 12 IN HELA-ZELLEN

Da auch in weiteren, hier nicht gezeigten Experimenten, kein deutlicher Effekt durch die artifizielle Nuklease zu bestimmen war und große Schwankungen in der Transfektionseffizienz auftraten, wurde das Testsystem von der Suspensionszelllinie K562 auf die adhärente Zelllinie HeLa gewechselt.

Des Weiteren wurden mehrere Kontrollen angepasst, um eine bessere Vergleichbarkeit zum Konjugat 12 Effekt erhalten zu können. Hierfür wurde wiederum die validierte Kontrollsequenz der Firma Dharmacon verwendet, welche auf der *C. elegans* miR-67 Sequenz basiert (miRIDIAN microRNA Mimics, Hairpin Inhibitors and Negative Controls). Diese wurde als DNA Oligonukleotid (M O) und ebenfalls als unspezifisches DNA/LNA Mixmer-Spaltkonjugat (M K) eingesetzt. Des Weiteren wurde ein GapmeR, welches ebenfalls gegen die siRNA1491 Bindestelle gerichtet ist, als zweite Transfektionskontrolle verwendet. Hierdurch lässt sich der Spalteffekt besser vergleichen und es kann überprüft werden, ob die Bindestelle auch ohne maturen RISC-Komplex zugänglich ist. Bei der Verwendung des GapmeRs wird die RNase H rekrutiert, was zu einer Spaltung der *PIMI* mRNA führt. Hierbei kommt es im Gegensatz zur RISC-Rekrutierung nicht zu einer größeren Komplex Assemblierung vor der Bindung an die mRNA.

Wie in Abb. 39 zu sehen, zeigt die Transfektion des GapmeRs einen deutlichen Effekt auf die PIM1 Expression, der ähnlich stark wie der durch die siRNA1491 ist, was die Zugänglichkeit der Bindungsstelle bestätigt. Die neuen Negativkontrollen (M O und M K) zeigen wie gewünscht keinen Effekt auf die PIM1 Expression, was jedoch ebenfalls auf das Konjugat 12 zutrifft.

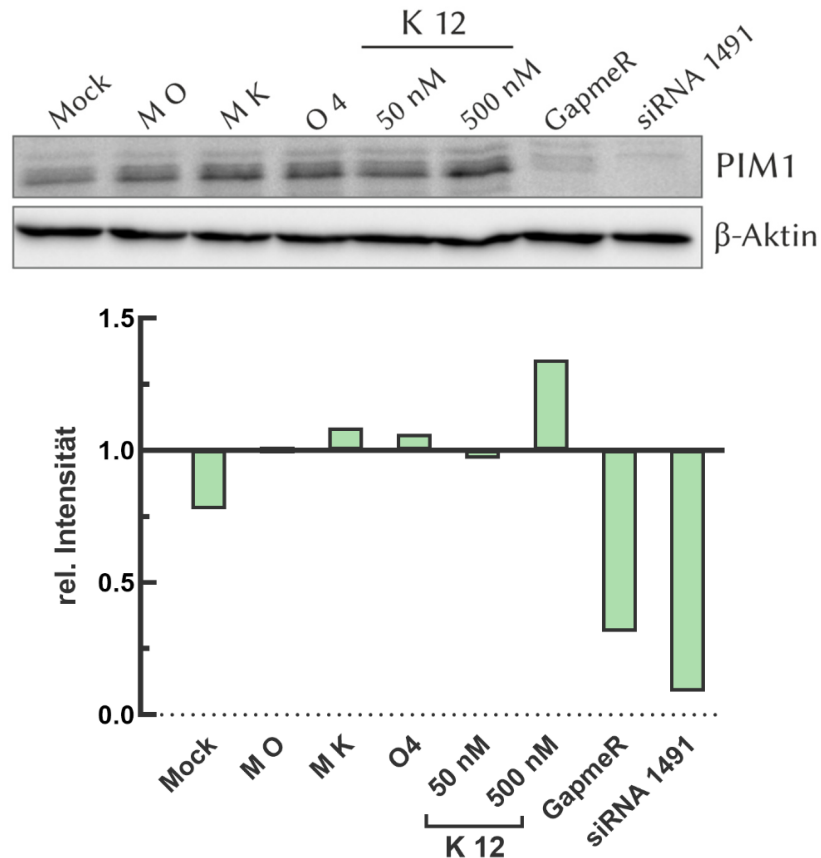


Abbildung 39: WB-Analyse nach Transfektion mit Konjugat 12 und neuen Kontrollen in HeLa-Zellen

Detektion der PIM1- (oben) sowie β -Aktin-Expression (unten). Das Konjugat 12 wurde 72 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit LipofectamineTM2000 in HeLa-Zellen transfiziert, sowie das unspezifische Oligonukleotid M O, das unspezifische Konjugat M K und das Antisense-Oligonukleotid 4 (O 4). Als weitere Kontrollen wurden die Transfektionskontrollen siRNA1491 (80 nM) und GapmeR (80 nM), wie auch ein unbehandeltes Zelllysate aufgetragen (Mock). Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (unterer Graph). Normalisiert wurde auf die Intensität der β -Aktin Banden sowie auf Kontrolle M O.

Da die HeLa Zelllinie eine sehr stabile Transfektionseffizienz zeigt, jedoch vermehrt Toxizitätsprobleme nach der Transfektion mit LipofectamineTM2000 auftraten, wurde das neue Reagenz LipofectamineTM3000 der Firma ThermoFisher getestet. Hierbei sollen die toxischen Nebenwirkungen verringert werden, bei gleichzeitig verbesserter Transfektionseffizienz. Das Ergebnis hierzu ist in Abb. 40 zu sehen. Die Proliferation und Viabilität der HeLa-Zellen wurde durch die Verwendung des neuen Transfektionsreagenzes optisch deutlich verbessert (nicht gezeigt), was im WB ebenfalls durch die stärkeren β -Aktin Banden deutlich wird. Hierbei wurde das gleiche

Lyseprotokoll angewendet und auch gleiches Volumen auf das SDS-Gel aufgetragen wie bei dem vorangegangenen Experiment, gezeigt in Abb. 39.

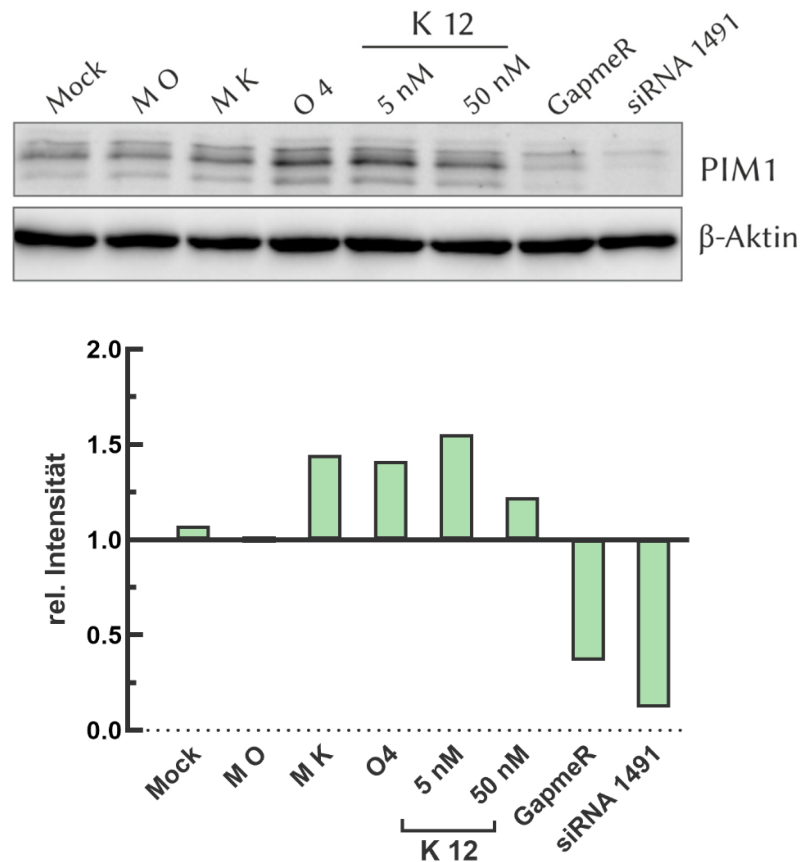


Abbildung 40: WB-Analyse nach LipofectamineTM3000 Transfektion mit Konjugat 12 in HeLa-Zellen

Detektion der PIM1- (oben) sowie β-Aktin-Expression (unten) mittels WB. Das Konjugat 12 wurde 72 Stunden zuvor in den jeweiligen Konzentrationen mit LipofectamineTM3000 in HeLa-Zellen transfiziert, sowie das unspezifische Oligonukleotid M O, das unspezifische Konjugat M K und das Antisense-Oligonukleotid 4 (O 4). Als weitere Kontrollen wurden die Transfektionskontrollen siRNA1491 (80 nM) und GapmeR (80 nM), wie auch ein unbehandeltes Zelllysate aufgetragen (Mock). Die Antikörperdetektion wurde mit Hilfe des ChemiDoc Geräts durchgeführt und die relativen Intensitäten der jeweiligen Antikörperbanden durch die Software ImageLab bestimmt (unterer Graph). Normalisiert wurde auf die Intensität der β-Aktin Banden sowie auf Kontrolle M O.

Beide Transfektionskontrollen zeigen einen deutlichen Effekt auf die PIM1 Expression, jedoch konnte wiederum keine Reduktion der Expression durch das Konjugat 12 beobachtet werden. Somit konnte das Ergebnis der ersten WB Experimente in K562-Zellen (Abb. 36 und 37) nicht reproduziert werden.

3.2.6. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

Ein Konjugat aus einem DNA/LNA Mixmer-Oligonukleotid und der synthetischen Ribonuklease Tris(2-aminobenzimidazol) wurde im zweiten Projekt dieser Arbeit untersucht. Im Vorfeld hatte die Arbeitsgruppe von Michael Göbel bereits vielversprechende Ergebnisse mit entsprechenden DNA- sowie PNA-Konjugaten erhalten, wobei jedoch nur kurze RNA-Substrate von einer Länge von bis zu 29 Nukleotiden untersucht wurden. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit getestet werden, ob die synthetische Nuklease ebenfalls in der Lage ist, längere und komplexere RNA-Substrate zu hydrolysieren. Dabei wurden RNA-Substrate ausgewählt, welche der bioinformatisch vorhergesagten Faltung der 3'-UTR der *PIM1* mRNA ähneln. Es konnte gezeigt werden, dass bei 155 und 412 Nukleotide langen RNA-Modellsubstraten der *PIM1* 3'-UTR spezifische Spaltprodukte entstehen, wobei die Kinetiken der Spaltung beider Substrate trotz des Längenunterschieds sowie partiell unterschiedlicher Faltungsvorhersagen sehr ähnlich waren. Darüber hinaus konnte durch den Wechsel von DNA- zu DNA/LNA Mixmer-Oligonukleotiden des Nuklease-Konjugats eine deutliche Beschleunigung der Spaltkinetik festgestellt werden. Dabei verringerte sich die Halbwertszeit der RNA-Substrate von 10 bis 20 Stunden auf etwa 4 Stunden. Durch ein *Primer-Extension* Experiment konnte gezeigt werden, dass die Spaltung durch das Tris(2-aminobenzimidazol) Konjugat spezifisch um das 3'-Ende des konjugierten Oligonukleotids und bis zu 5 Nukleotide innerhalb der Bindung zur adressierten Sequenz auftritt.

Aufgrund dieser vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse wurden Zellkulturexperimente in der K562-Zelllinie durchgeführt. In ersten WB-Analysen konnte eine starke Reprimierung der PIM1-Kinase durch Transfektion des Nuklease-Konjugats beobachtet werden, was sich jedoch in Folgeexperimenten nicht reproduzieren ließ. Ein Antisense-Effekt durch das konjugierte Oligonukleotid konnte durch eingesetzte Negativkontrollen ausgeschlossen werden. Aufgrund erheblicher Schwankungen der Transfektionseffizienz in K562-Zellen, wurden weitere Analysen in HeLa-Zellen durchgeführt, wobei jedoch auch nach einem Wechsel auf das effizientere Transfektionsreagenz LipofectamineTM3000 die anfänglich beobachteten Effekte durch das Nuklease Konjugat nicht reproduziert werden konnten.

Mögliche Gründe für das Ausbleiben eines stabilen Nuklease-Konjugat Effekts in den Zellkulturexperimenten könnten sein:

1. Dynamik der PIM1-Expression

Wie schon im Kontext des RISC-Umleitungs-Projekts erwähnt, besitzt die PIM1 Kinase auf mRNA- und Proteinebene eine kurze Halbwertszeit. Diese unterscheidet sich je nach Zellart und Stimulierungsstatus. Auch wenn bei den *in vitro* Spaltkinetiken die Halbwertszeit der RNA-Substrate auf 3-4 Stunden verringert werden konnte, ist dies womöglich immer noch zu langsam für einen effizienten und messbaren Effekt auf die Expression von PIM1, da die natürliche Halbwertszeit der mRNA geringer ist. Zudem ist die Bindung an die *PIMI* mRNA durch die Eigenschaften der LNA-Nukleotide sehr stabil, was einen mehrfachen Umsatz von RNA-Substraten unwahrscheinlich macht.

Dass im Gegensatz dazu ein Effekt bei der siRNA Positivkontrolle zu beobachten ist, lässt sich durch den katalytischen RNAi-Mechanismus und die schnelle hAGO2-Spaltkinetik erklären (Willkomm & Restle, 2017). Im Fall der endogenen RNase H, die durch das GapmeR rekrutiert wird, ist die Spaltkinetik ebenfalls um einiges schneller als für das getestete Nuklease-Konjugat (Honcharenko et al., 2007), sodass der Reprimierungseffekt hier nicht durch die kurze mRNA Halbwertszeit von *PIMI* maskiert wird. Darüber hinaus kann - wie schon im Kontext des RISC-Umleitungsprojekts diskutiert - zellulärer Stress die PIM1-Expression beeinflussen.

2. Veränderte Nuklease Aktivität innerhalb der Zelle

Ein weiterer Grund für den instabilen Effekt des Nuklease-Konjugats kann eine Funktionsbeeinträchtigung innerhalb des zellulären Milieus sein. Im Vorfeld der zellulären Untersuchungen wurden Spaltkinetiken in Phosphatpuffer von der Arbeitsgruppe Göbel durchgeführt, um ausschließen zu können, dass Sulfate oder Phosphate innerhalb der Zelle die Spaltungseigenschaften beeinträchtigen. Hierbei konnte jedoch kein Einfluss auf die Spaltgeschwindigkeit festgestellt werden.

Ungeachtet dessen wurden die Spaltkinetiken in einem stabilen Puffersystem durchgeführt. Da der pH-Wert jedoch innerhalb der Zelle sowie während der Transfektion nicht kontrolliert werden kann, ist es dennoch möglich, dass die Spalteigenschaften des Konjugats intrazellulär verändert waren.

3.2.7. AUSBLICK

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse bei den Spaltkinetiken *in vitro* sowie der Nichtnachweisbarkeit toxischer Nebeneffekte des Nuklease-Konjugats in den zellulären Tests, sollte eine weitere Optimierung der Zellkulturexperimente durchgeführt werden.

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der *PIMI* mRNA sind weitere zelluläre Analysen mit einer stabileren Target-mRNA sinnvoll. So kann ausgeschlossen werden, dass der Effekt einer funktionsfähigen Spaltung der mRNA innerhalb der Zelle von deren generell schnellem Abbau überdeckt wird. So könnte z.B. die Spaltung der β -Globin mRNA innerhalb der Zelle untersucht werden, welche eine Halbwertszeit von über 20 Stunden aufweist (van Zalen et al., 2015). Sollte *PIMI* weiterhin als Target-mRNA adressiert werden, könnten ebenfalls die im Ausblick des RISC-Umleitungs-Projekts genannten Möglichkeiten, wie z.B. die Deletion der ARE-Elemente, genutzt werden, um die Stabilität der *PIMI* mRNA zu erhöhen. Außerdem sollte neben der WB-Analyse ein direkter Spaltnachweis durch die Quantifizierung der mRNA-Spiegel mittels qRT-PCR erfolgen. So können indirekte Einflüsse auf die PIM1-Proteinexpression ausgeschlossen werden, was bei der WB-Analyse nicht möglich ist.

Nichtsdestotrotz sollte neben dem direkten Nachweis der Spaltaktivität auch eine weitere Optimierung der Spaltkinetiken angestrebt werden, da unter normalen Bedingungen das Tris(2-aminobenzimidazol) Konjugat immer noch zu langsame Kinetiken aufweist, um als mögliche Therapiealternative in Frage zu kommen. Proto-Onkogene besitzen sehr häufig eine kurze Halbwertszeit auf mRNA-Ebene. Diese enge und schnelle Regulation ist essenziell, um in normalen Zellen onkogene Wirkungen zu unterdrücken. Neben den chemischen Eigenschaften des Tris(2-aminobenzimidazol) ist eine weitere Optimierung ebenfalls über das konjugierte Oligonukleotid möglich, was in dieser Arbeit durch den Wechsel hin zu DNA/LNA-Mixmeren gezeigt werden konnte. So wäre z.B. durch eine

Veränderung der Konjugatposition oder der LNA-Anteile eine weitere Verbesserung im Bereich des Möglichen. 2015 konnte gezeigt werden, dass Konjugate, bei denen die synthetische Nuklease an eine interne Position im Oligonukleotid konjugiert wurde, ebenfalls in der Lage sind, RNA-Substrate zu spalten (Dogandzhiyski et al., 2015). Somit stehen noch einige Ansätze für eine Optimierung der Nuklease-Konjugate zur Verfügung, um das Ziel einer intrazellulären mRNA-Inaktivierung zu erreichen.

4.LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. In *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc2657>
- Adams, D., Gonzalez-Duarte, A., O’Riordan, W. D., Yang, C. C., Ueda, M., Kristen, A. V., Tournev, I., Schmidt, H. H., Coelho, T., Berk, J. L., Lin, K. P., Vita, G., Attarian, S., Planté-Bordeneuve, V., Mezei, M. M., Campistol, J. M., Buades, J., Brannagan, T. H., Kim, B. J., ... Suhr, O. B. (2018). Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716153>
- Aho, T. L. T., Sandholm, J., Peltola, K. J., Mankonen, H. P., Lilly, M., & Koskinen, P. J. (2004). Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Letters*, 571(1–3), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.050>
- Altmann, K. H., Fabbro, D., Dean, N. M., Geiger, T., Monia, B. P., Müller, M., & Nicklin, P. (1996). Second-generation antisense oligonucleotides: Structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/bst0240630>
- Amantana, A., & Iversen, P. L. (2005). Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. In *Current Opinion in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.07.001>
- Ameyar-Zazoua, M., Rachez, C., Souidi, M., Robin, P., Fritsch, L., Young, R., Morozova, N., Fenouil, R., Descostes, N., Andrau, J. C., Mathieu, J., Hamiche, A., Ait-Si-Ali, S., Muchardt, C., Batsché, E., & Harel-Bellan, A. (2012). Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2373>
- Arbab, A. S., Yocum, G. T., Wilson, L. B., Parwana, A., Jordan, E. K., Kalish, H., & Frank, J. A. (2004). Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability. *Molecular Imaging*. <https://doi.org/10.1162/153535004773861697>
- Bachmann, M., & Möröy, T. (2005). The serine/threonine kinase Pim-1. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.11.005>
- Bashirullah, A., Pasquinelli, A. E., Kiger, A. A., Perrimon, N., Ruvkun, G., & Thummel, C. S. (2003). Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of Drosophila metamorphosis. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00063-0)
- Beloglazova, N. G., Epanchintsev, A. I., Sil’nikov, V. N., Zenkova, M. A., & Vlasov, V. V. (2002). Highly efficient site-directed RNA cleavage by imidazole-containing conjugates of

- antisense oligonucleotides. *Molekuliarnaia Biologiya*.
- Bhattacharya, N., Wang, Z., Davitt, C., McKenzie, I. F. C., Xing, P. X., & Magnuson, N. S. (2002). Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma*, 111(2), 80–95. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0192-6>
- Blanco, F. F., Jimbo, M., Wulfschlegel, J., Gallagher, I., Deng, J., Enyenihi, L., Meisner-Kober, N., Londin, E., Rigoutsos, I., Sawicki, J. A., Risbud, M. V., Witkiewicz, A. K., McCue, P. A., Jiang, W., Rui, H., Yeo, C. J., Petricoin, E., Winter, J. M., & Brody, J. R. (2016). The mRNA-binding protein HuR promotes hypoxia-induced chemoresistance through posttranscriptional regulation of the proto-oncogene PIM1 in pancreatic cancer cells. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.325>
- Blom, D. J., Cuchel, M., Ager, M., & Phillips, H. (2018). Target achievement and cardiovascular event rates with Lomitapide in homozygous Familial Hypercholesterolaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0841-3>
- Boland, A., Tritschler, F., Heimstädt, S., Izaurralde, E., & Weichenrieder, O. (2010). Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.81>
- Braun, J. E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C. Te, Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., & Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2413>
- Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L., & Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1173>
- Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., & Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004>
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., & Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.171251798>
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Cen, B., Xiong, Y., Song, J. H., Mahajan, S., DuPont, R., McEachern, K., DeAngelo, D. J., Cortes, J. E., Minden, M. D., Ebens, A., Mims, A., LaRue, A. C., & Kraft, A. S. (2014). The Pim-1 Protein Kinase Is an Important Regulator of MET Receptor Tyrosine Kinase Levels and Signaling. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00147-14>
- Cerritelli, S. M., & Crouch, R. J. (1995). The non-RNase H domain of *Saccharomyces cerevisiae*

- RNase H1 binds double-stranded RNA: Magnesium modulates the switch between double-stranded RNA binding and RNase H activity. *RNA*.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W., & Hannon, G. J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature09092>
- Chen, A., Huang, X., Xue, Z., Cao, D., Huang, K., Chen, J., Pan, Y., & Gao, Y. (2015). The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes. *Medical Science Monitor Basic Research*.
<https://doi.org/10.12659/MSMBR.893608>
- Chen, P. S., Su, J. L., & Hung, M. C. (2012). Dysregulation of MicroRNAs in cancer. In *Journal of Biomedical Science*. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-90>
- Chirshv, E., Oberg, K. C., Ioffe, Y. J., & Unternaehrer, J. J. (2019). Let-7 as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer. *Clinical and Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s40169-019-0240-y>
- Christie, M., Boland, A., Huntzinger, E., Weichenrieder, O., & Izaurralde, E. (2013). Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.011>
- Cotton, F. A., Hazen, E. E., & Legg, M. J. (1979). Staphylococcal nuclease: Proposed mechanism of action based on structure of enzyme-thymidine 3',5'-bisphosphate-calcium ion complex at 1.5-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.6.2551>
- Crooke, S. (2005). Antisense Strategies. *Current Molecular Medicine*.
<https://doi.org/10.2174/1566524043360375>
- Crooke, S. T. (2000). Progress in antisense technology: The end of the beginning. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)13003-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)13003-4)
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., & Borden, K. L. B. (2006). eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *Journal of Cell Biology*, 175(3), 415–426. <https://doi.org/10.1083/jcb.200607020>
- Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J. A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J., & Brennecke, J. (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature07007>
- Danneberg, F., Ghidini, A., Dogandzhiyski, P., Kalden, E., Strömberg, R., & Göbel, M. W. (2015). Sequence-specific RNA cleavage by PNA conjugates of the metal-free artificial ribonuclease tris(2-aminobenzimidazole). *Beilstein Journal of Organic Chemistry*.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.11.55>
- Dash, B. C., & El-Deiry, W. S. (2005). Phosphorylation of p21 in G2/M Promotes Cyclin B-

- Cdc2 Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology*.
<https://doi.org/10.1128/mcb.25.8.3364-3387.2005>
- De Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A. M., Carlisle, A. J., Daub, C. O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., Ha, T. J., ... De Hoon, M. J. L. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, 35(9), 872–878. <https://doi.org/10.1038/nbt.3947>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature03049>
- DeVincenzo, J., Lambkin-Williams, R., Wilkinson, T., Cehelsky, J., Nochur, S., Walsh, E., Meyers, R., Gollob, J., & Vaishnav, A. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912186107>
- Dews, M., Fox, J. L., Hultine, S., Sundaram, P., Wang, W., Liu, Y. Y., Furth, E., Enders, G. H., El-Deiry, W., Schelter, J. M., Cleary, M. A., & Thomas-Tikhonenko, A. (2010). The Myc-miR-17~92 axis blunts TGFβ signaling and production of multiple TGFβ-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2412>
- Dogandzhiyski, P., Ghidini, A., Danneberg, F., Strömberg, R., & Göbel, M. W. (2015). Studies on Tris(2-aminobenzimidazole)-PNA Based Artificial Nucleases: A Comparison of Two Analytical Techniques. *Bioconjugate Chemistry*.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00534>
- Drexler, H. G. (1994). Leukemia cell lines: In vitro models for the study of chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0145-2126(94)90103-1)
- Duell, P. B., Santos, R. D., Kirwan, B. A., Witztum, J. L., Tsimikas, S., & Kastelein, J. J. P. (2016). Long-term mipomersen treatment is associated with a reduction in cardiovascular events in patients with familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.04.013>
- Eckstein, F. (2000). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: What is their origin and what is unique about them? In *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*.
<https://doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.117>
- Eder, P. S., & Walder, J. A. (1991). Ribonuclease H from K562 human erythroleukemia cells: Purification, characterization, and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*.
- Eichhorn, G. L., & Butzow, J. J. (1965). Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds. III. Degradation of polyribonucleotides by lanthanum ions,. *Biopolymers*. <https://doi.org/10.1002/bip.360030109>

- Eichmann, A., Yuan, L., Bréant, C., Alitalo, K., & Koskinen, P. J. (2000). Developmental expression of Pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system. *Oncogene*, 19(9), 1215–1224. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203355>
- Eiring, A. M., Harb, J. G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J. J., Spizzo, R., Liu, S., Schwind, S., Santhanam, R., Hickey, C. J., Becker, H., Chandler, J. C., Andino, R., Cortes, J., Hokland, P., Huettner, C. S., Bhatia, R., Roy, D. C., Liebhaber, S. A., ... Perrotti, D. (2010). miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.007>
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35078107>
- Ellwanger, D. C., Büttner, F. A., Mewes, H. W., & Stümpflen, V. (2011). The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr149>
- Faehnle, C. R., Elkayam, E., Haase, A. D., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2013). The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.033>
- Farberov, L., Herzig, E., Modai, S., Isakov, O., Hizi, A., & Shomron, N. (2015). MicroRNA-mediated regulation of p21 and TASK1 cellular restriction factors enhances HIV-1 infection. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.167817>
- Ferrándiz, N., Caraballo, J. M., García-Gutierrez, L., Devgan, V., Rodriguez-Paredes, M., Lafita, M. C., Bretones, G., Quintanilla, A., Muñoz-Alonso, M. J., Blanco, R., Reyes, J. C., Agell, N., Delgado, M. D., Dotto, G. P., & León, J. (2012). P21 as a transcriptional co-repressor of S-phase and mitotic control genes. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037759>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fiszer-Kierzkowska, A., Vydra, N., Wysocka-Wycisk, A., Kronekova, Z., Jarzab, M., Lisowska, K. M., & Krawczyk, Z. (2011). Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-27>
- Fogh, J., Wright, W. C., & Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/58.2.209>
- Frank, P., Braunshofer-Reiter, C., Poltl, A., & Holzmann, K. (1998). Cloning, subcellular localization and functional expression of human RNase HII. *Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.12.1407>

- Franklin, S. J. (2001). Lanthanide-mediated DNA hydrolysis. In *Current Opinion in Chemical Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00191-5)
- Gantier, M. P., & Williams, B. R. G. (2007). The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine and Growth Factor Reviews*.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.016>
- Gartel, A. L. (2006). Is p21 an oncogene? In *Molecular Cancer Therapeutics*.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0163>
- Gates, K. S. (2009). An overview of chemical processes that damage cellular DNA: Spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. In *Chemical Research in Toxicology*. <https://doi.org/10.1021/tx900242k>
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M. D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E. L. W., Zapp, M. L., Weng, Z., & Zamore, P. D. (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1157396>
- Ghosh, S., Guimaraes, J., Lanzafame, M., Schmidt, A., Syed, A., Dimitriades, B., Boersch, A., Ghosh, S., Correia, A., Danner, J., Meister, G., Terracciano, L., Piscuoglio, S., & Zavolan, M. (2019). AGO1x prevents dsRNA-induced interferon signaling to promote breast cancer cell proliferation. *BioRxiv Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/603506>
- Gleave, M. E., & Monia, B. P. (2005). Antisense therapy for cancer. In *Nature Reviews Cancer*.
<https://doi.org/10.1038/nrc1631>
- Gnaccarini, C., Peter, S., Scheffer, U., Vonhoff, S., Klussmann, S., & Göbel, M. W. (2006). Site-specific cleavage of RNA by a metal-free artificial nuclease attached to antisense oligonucleotides. *Journal of the American Chemical Society*.
<https://doi.org/10.1021/ja061036f>
- Göbel, M. W., Bolz, M., Thomas, L., Scheffer, U., Kalden, E., & Hartmann, R. K. (2020). Redirection of miRNA-Argonaute Complexes to Specific Target Sites by Synthetic Adaptor Molecules. *Chemistry & Biodiversity*, cbdv.202000272.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.202000272>
- Gorospe, M., Wang, X., & Holbrook, N. J. (1999). Functional role of p21 during the cellular response to stress. *Gene Expression*.
- Goyal, N., & Narayanaswami, P. (2018). Making sense of antisense oligonucleotides: A narrative review. In *Muscle and Nerve*. <https://doi.org/10.1002/mus.26001>
- Großhans, H., Johnson, T., Reinert, K. L., Gerstein, M., & Slack, F. J. (2005). The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.12.019>
- Gu, S., Jin, L., Huang, Y., Zhang, F., & Kay, M. A. (2012). Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain. *Current Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.040>

- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>
- Hauptmann, J., Dueck, A., Harlander, S., Pfaff, J., Merkl, R., & Meister, G. (2013). Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2577>
- Hayes, J., Peruzzi, P. P., & Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. In *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>
- Hertel, J., Bartschat, S., Wintsche, A., Otto, C., & Stadler, P. F. (2012). Evolution of the let-7 microRNA Family. *RNA Biology*. <https://doi.org/10.4161/rna.18974>
- Holland, T. A., Elder, J., McCloud, J. M., Hall, C., Deakin, M., Fryer, A. A., Elder, J. B., & Hoban, P. R. (2001). Subcellular localisation of cyclin D1 protein in colorectal tumours is associated with p21WAF1/CIP1 expression and correlates with patient survival. *International Journal of Cancer*. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010920\)95:5<302::aid-ijc1052>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010920)95:5<302::aid-ijc1052>3.0.co;2-%23)
- Hoover, D. S., Wingett, D. G., Zhang, J., Reeves, R., & Magnuson, N. S. (1997). Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E. *Cell Growth and Differentiation*, 8(12), 1371–1380.
- Hu, P. P. C., Shen, X., Huang, D., Liu, Y., Counter, C., & Wang, X. F. (1999). The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor- β . *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35381>
- Huang, S., Shu, L., Dilling, M. B., Easton, J., Harwood, F. C., Ichijo, H., & Houghton, P. J. (2003). Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21Cip1. *Molecular Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00180-1)
- Huranová, M., Jablonski, J. A., Benda, A., Hof, M., Staněk, D., & Caputi, M. (2009). In vivo detection of RNA-binding protein interactions with cognate RNA sequences by fluorescence resonance energy transfer. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.1678209>
- Iadevaia, V., Caldarola, S., Biondini, L., Gismondi, A., Karlsson, S., Dianzani, I., & Loreni, F. (2010). PIM1 kinase is destabilized by ribosomal stress causing inhibition of cell cycle progression. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.279>
- Ibrahim, A. F., Weirauch, U., Thomas, M., Grüneweller, A., Hartmann, R. K., & Aigner, A. (2011). MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4645>

- Ivanovska, I., Ball, A. S., Diaz, R. L., Magnus, J. F., Kibukawa, M., Schelter, J. M., Kobayashi, S. V., Lim, L., Burchard, J., Jackson, A. L., Linsley, P. S., & Cleary, M. A. (2008). MicroRNAs in the miR-106b Family Regulate p21/CDKN1A and Promote Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.01977-07>
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.015>
- Iyer, R. S., Chatham, L., Sleight, R., & Meek, D. W. (2017). A functional SUMO-motif in the active site of PIM1 promotes its degradation via RNF4, and stimulates protein kinase activity. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03775-w>
- Jabs, D. A., & Griffiths, P. D. (2002). Fomivirsen for the treatment of cytomegalovirus retinitis. In *American Journal of Ophthalmology*. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)01325-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(02)01325-9)
- Jinek, M., & Doudna, J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07755>
- Jo, M. H., Shin, S., Jung, S. R., Kim, E., Song, J. J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.027>
- Johansson, H. E., Helsham, G. J., Sproat, B. S., & Hentze, M. W. (1994). Target-specific arrest of mrna translation by antisense 2'-o-alkyloligoribonucleotides. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4591>
- Johnson, C. D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., Chin, L., Brown, D., & Slack, F. J. (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1083>
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., & Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.014>
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>
- Jung, P., Menssen, A., Mayr, D., & Hermeking, H. (2008). AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801773105>
- Jung, Y. S., Qian, Y., & Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. In *Cellular Signalling*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.013>
- Karimian, A., Ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. In *DNA Repair*.

- <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>
- Katsube, A., Hayashi, H., & Kusuhara, H. (2016). Pim-1L Protects Cell Surface-Resident ABCA1 from Lysosomal Degradation in Hepatocytes and Thereby Regulates Plasma High-Density Lipoprotein Level. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(12), 2304–2314. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308472>
- Kawamata, T., Seitz, H., & Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1630>
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. In *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>
- Kerpedjiev, P., Hammer, S., & Hofacker, I. L. (2015). Forna (force-directed RNA): Simple and effective online RNA secondary structure diagrams. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv372>
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00801-8)
- Kiełpiński, Ł. J., Hagedorn, P. H., Lindow, M., & Vinther, J. (2017). RNase H sequence preferences influence antisense oligonucleotide efficiency. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1073>
- Kim, H. K., Kim, C. W., Vo, M. T., Lee, H. H., Lee, J. Y., Yoon, N. A., Lee, C. Y., Moon, C. H., Min, Y. J., Park, J. W., & Cho, W. J. (2012). Expression of proviral integration site for moloney murine leukemia virus 1 (Pim-1) is post-transcriptionally regulated by tristetrapirolin in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376483>
- Kim, O., Jiang, T., Xie, Y., Guo, Z., Chen, H., & Qiu, Y. (2004). Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene*, 23(10), 1838–1844. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207304>
- Kim, Y. K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601512>
- Kleinman, M. E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J. Z., Albuquerque, R. J. C., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Karikó, K., Ambati, B. K., Wilgus, T. A., DiPietro, L. A., Sakurai, E., Zhang, K., ... Ambati, J. (2008). Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06765>
- Koike, N., Maita, H., Taira, T., Ariga, H., & Iguchi-Ariga, S. M. M. (2000). Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01105-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01105-4)

- Komiyama, M., & Inokawa, T. (1994). Selective hydrolysis of tRNA by ethylenediamine bound to a DNA oligomer. *Journal of Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124586>
- Koppelhus, U., & Nielsen, P. E. (2003). Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). *Advanced Drug Delivery Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00182-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00182-5)
- Kumar, M. S., Erkeland, S. J., Pester, R. E., Chen, C. Y., Ebert, M. S., Sharp, P. A., & Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0712321105>
- Kurreck, J. (2002). Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.1911>
- Kurreck, Jens. (2003). Antisense technologies: Improvement through novel chemical modifications. In *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x>
- Kwak, P. B., & Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural and Molecular Biology*.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2232>
- Lancman, J. J., Caruccio, N. C., Harfe, B. D., Pasquinelli, A. E., Schageman, J. J., Pertsemliadis, A., & Fallon, J. F. (2005). Analysis of the regulation of lin-41 during chick and mouse limb development. *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20591>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. In *Cell*.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00035-2)
- Lee, S., & Helfman, D. M. (2004). Cytoplasmic p21Cip1 Is Involved in Ras-induced Inhibition of the ROCK/LIMK/Cofilin Pathway. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M306968200>
- Lei, X., Liu, B., Han, W., Ming, M., & He, Y. Y. (2010). UVB-Induced p21 degradation promotes apoptosis of human keratinocytes. *Photochemical and Photobiological Sciences*.
<https://doi.org/10.1039/c0pp00244e>
- Lewis, P. J., & Errington, J. (1996). Use of green fluorescent protein for detection of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in Bacillus subtilis. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-4-733>
- Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., & Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/371534a0>

- Li, Y., Dowbenko, D., & Lasky, L. A. (2002). AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109062200>
- Liang, X. H., Sun, H., Nichols, J. G., & Crooke, S. T. (2017). RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.002>
- Lima, W. F., Murray, H. M., Damle, S. S., Hart, C. E., Hung, G., De Hoyos, C. L., Liang, X. H., & Crooke, S. T. (2016). Viable RNaseH1 knockout mice show RNaseH1 is essential for R loop processing, mitochondrial and liver function. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw350>
- Lima, W. F., Nichols, J. G., Wu, H., Prakash, T. P., Migawa, M. T., Wyrzykiewicz, T. K., Bhat, B., & Crooke, S. T. (2004). Structural requirements at the catalytic site of the heteroduplex substrate for human RNase H1 catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405035200>
- Liu, B., Liu, M., Wang, J., Zhang, X., Wang, X., Wang, P., Wang, H., Li, W., & Wang, Y. (2015). DICER-dependent biogenesis of let-7 miRNAs affects human cell response to DNA damage via targeting p21/p27. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1368>
- Liu, S. Q., Jiang, S., Li, C., Zhang, B., & Li, Q. J. (2014). Mir-17-92 cluster targets phosphatase and tensin homology and ikaros family zinc finger 4 to promote th17-mediated inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550723>
- Liu, Y., Shang, Y., Yan, Z., Li, H., Wang, Z., Liu, Z., & Li, Z. (2019). Pim1 kinase positively regulates myoblast behaviors and skeletal muscle regeneration. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1993-3>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lönnberg, H. (2011). Cleavage of RNA phosphodiester bonds by small molecular entities: A mechanistic insight. In *Organic and Biomolecular Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/c0ob00486c>
- Losman, J. A., Chen, X. P., Vuong, B. Q., Fay, S., & Rothman, P. B. (2003). Protein phosphatase 2A regulates the stability of Pim protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4800–4805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208246200>
- Lytle, J. R., Yario, T. A., & Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703820104>

- Ma, J., Arnold, H. K., Lilly, M. B., Sears, R. C., & Kraft, A. S. (2007). Negative regulation of Pim-1 protein kinase levels by the B56 β subunit of PP2A. *Oncogene*, 26(35), 5145–5153.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210323>
- Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., & Jacks, T. (1995). p53-Dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes and Development*.
<https://doi.org/10.1101/gad.9.8.935>
- Magda, D., Crofts, S., Lin, A., Miles, D., Wright, M., & Sessler, J. L. (1997). Synthesis and kinetic properties of ribozyme analogues prepared using phosphoramidite derivatives of dysprosium(III) texaphyrin. *Journal of the American Chemical Society*.
<https://doi.org/10.1021/ja9627149>
- Magnuson, N. S., Wang, Z., Ding, G., & Reeves, R. (2010). Why target PIM1 for cancer diagnosis and treatment? In *Future Oncology*. <https://doi.org/10.2217/fon.10.106>
- Mahat, D. B., Brennan-Laun, S. E., Fialcowitz-White, E. J., Kishor, A., Ross, C. R., Pozharskaya, T., Rawn, J. D., Blackshear, P. J., Hassel, B. A., & Wilson, G. M. (2012). Coordinated expression of tristetraprolin post-transcriptionally attenuates mitogenic induction of the oncogenic ser/thr kinase Pim-1. *PLoS ONE*, 7(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033194>
- Maita, H., Harada, Y., Nagakubo, D., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Takahashi, K., Ariga, H., & Iguchi-Ariga, S. M. M. (2000). PAP-1, a novel target protein of phosphorylation by Pim-1 kinase. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 5168–5178.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01585.x>
- Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., Turchinovich, A. A., & Tonevitsky, A. G. (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. In *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.proghi.2016.06.001>
- Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenaus, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., Sharp, P. A., Tabin, C. J., & McManus, M. T. (2004). MicroRNA-responsive “sensor” transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1421>
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044>
- McKay, R. A., Miraglia, L. J., Cummins, L. L., Owens, S. R., Sasmor, H., & Dean, N. M. (1999). Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase C- α expression. *Journal of Biological Chemistry*.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1715>
- Meeker, T. C., Loeb, J., Ayres, M., & Sellers, W. (1990). The human Pim-1 gene is selectively transcribed in different hemato-lymphoid cell lines in spite of a G + C-rich housekeeping promoter. *Molecular and Cellular Biology*.
<https://doi.org/10.1128/mcb.10.4.1680>
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature02873>
- Mikkers, H., Nawijn, M., Allen, J., Brouwers, C., Verhoeven, E., Jonkers, J., & Berns, A. (2004). Mice Deficient for All PIM Kinases Display Reduced Body Size and Impaired Responses to Hematopoietic Growth Factors. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 6104–6115.
<https://doi.org/10.1128/mcb.24.13.6104-6115.2004>
- Miura, O., Miura, Y., Nakamura, N., Quelle, F. W., Witthuhn, B. A., Ihle, J. N., & Aoki, N. (1994). Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor. *Blood*.
<https://doi.org/10.1182/blood.v84.12.4135.bloodjournal84124135>
- Mizuno, K., Shirogane, T., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Hibi, M., & Hirano, T. (2001). Regulation of Pim-1 by Hsp90. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4405>
- Mochizuki, T., Kitanaka, C., Noguchi, K., Muramatsu, T., Asai, A., & Kuchino, Y. (1999). Physical and functional interactions between pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18659–18666. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18659>
- Mogilyansky, E., & Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: A comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. In *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.125>
- Morishita, D., Katayama, R., Sekimizu, K., Tsuruo, T., & Fujita, N. (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Research*, 68(13), 5076–5085.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0634>
- Mullan, P. B., Quinn, J. E., & Harkin, D. P. (2006). The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. In *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209872>
- Müller, M., Fazi, F., & Ciaudo, C. (2020). Argonaute Proteins: From Structure to Function in Development and Pathological Cell Fate Determination. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00360>

- Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T., & Shimotohno, K. (2006). Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209283>
- Muraski, J. A., Rota, M., Misao, Y., Fransioli, J., Cottage, C., Gude, N., Esposito, G., Delucchi, F., Arcarese, M., Alvarez, R., Siddiqi, S., Emmanuel, G. N., Wu, W., Fischer, K., Martindale, J. J., Glembotski, C. C., Leri, A., Kajstura, J., Magnuson, N., ... Sussman, M. A. (2007). Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nature Medicine*, 13(12), 1467–1475. <https://doi.org/10.1038/nm1671>
- Murtola, M., Wenska, M., & Strömberg, R. (2010). PNAzymes that are artificial RNA restriction enzymes. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja1008739>
- Nagahama, K., Veedu, R. N., & Wengel, J. (2009). Nuclease resistant methylphosphonate-DNA/LNA chimeric oligonucleotides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.116>
- Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P., & Patel, D. J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11211>
- Nawijn, M. C., Alendar, A., & Berns, A. (2011). For better or for worse: The role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), 23–34. <https://doi.org/10.1038/nrc2986>
- Nelson, M. H., Stein, D. A., Kroeker, A. D., Hatlevig, S. A., Iversen, P. L., & Moulton, H. M. (2005). Arginine-rich peptide conjugation to morpholino oligomers: Effects on antisense activity and specificity. *Bioconjugate Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/bc0501045>
- Nielsen, P. E. (2004). PNA technology. In *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:233>
- Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., & Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1962210>
- Noland, C. L., & Doudna, J. A. (2013). Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.037424.112>
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03677>
- Obad, S., Dos Santos, C. O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E. M., Hansen, H. F., Koch, T., Pappin, D., Hannon, G. J., & Kauppinen, S. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.786>
- Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K. I., In, Y., Ishida, T., & Imanishi, T. (1997). Synthesis of

- 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed c3-endo sugar puckering. *Tetrahedron Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)10322-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10322-7)
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., & Tsukihara, T. (2009). A high-Resolution structure of the pre-microrna nuclear export machinery. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1178705>
- Okamura, K., & Lai, E. C. (2008). Endogenous small interfering RNAs in animals. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2479>
- Orban, T. I., & Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.7231505>
- Owczarzy, R., You, Y., Groth, C. L., & Tataurov, A. V. (2011). Stability and mismatch discrimination of locked nucleic acid-DNA duplexes. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi200904e>
- Pardali, K., Kowanetz, M., Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2005). Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21WAF1/Cip1. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.20304>
- Park, J. E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., Patel, D. J., & Kim, V. N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10198>
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S. K., Küppers, R., & Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 412(6844), 341–346. <https://doi.org/10.1038/35085588>
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35040556>
- Patutina, O. A., Miroshnichenko, S. K., Mironova, N. L., Sen'kova, A. V., Bichenkova, E. V., Clarke, D. J., Vlassov, V. V., & Zenkova, M. A. (2019). Catalytic knockdown of MIR-21 by artificial Ribonuclease: Biological performance in tumor model. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00879>
- Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, R. K. S., Malakar, A. K., & Chakraborty, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. In *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.25854>
- Peacey, E., Rodriguez, L., Liu, Y., & Wolfe, M. S. (2012). Targeting a pre-mRNA structure with bipartite antisense molecules modulates tau alternative splicing. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks710>
- Pelengaris, S., Khan, M., & Evan, G. (2002). c-MYC: More than just a matter of life and death.

- In *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc904>
- Piatek, A. M., Gray, M., & Anslyn, E. V. (2004). Guanidinium groups act as general-acid catalysts in phosphoryl transfer reactions: A two-proton inventory on a model system. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja046894v>
- Piatek, M. J., & Werner, A. (2014). Endogenous siRNAs: Regulators of internal affairs. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST20140068>
- Place, R. F., Li, L. C., Pookot, D., Noonan, E. J., & Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707594105>
- Polyak, K., Waldman, T., He, T. C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.10.15.1945>
- Putnam, W. C., & Bashkin, J. K. (2000). De novo synthesis of artificial ribonucleases with benign metal catalysts. *Chemical Communications*. <https://doi.org/10.1039/a908783d>
- Pützer, B. M., & Engelmann, D. (2013). E2F1 apoptosis counterattacked: Evil strikes back. In *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.10.009>
- Quévillon Huberdeau, M., Zeitler, D. M., Hauptmann, J., Bruckmann, A., Fressigné, L., Danner, J., Piquet, S., Strieder, N., Engelmann, J. C., Jannot, G., Deutzmann, R., Simard, M. J., & Meister, G. (2017). Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for micro RNA -guided gene silencing in vivo . *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/emj.201696386>
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., & Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.020>
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquienell, A. E., Bettlnger, J. C., Rougvle, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Rosta, E., Nowotny, M., Yang, W., & Hummer, G. (2011). Catalytic mechanism of RNA backbone cleavage by ribonuclease H from quantum mechanics/molecular mechanics simulations. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja200173a>
- Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. In *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>
- Ruby, J. G., Jan, C., Player, C., Axtell, M. J., Lee, W., Nusbaum, C., Ge, H., & Bartel, D. P. (2006). Large-Scale Sequencing Reveals 21U-RNAs and Additional MicroRNAs and Endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.040>
- Rupert, P. B., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2001). Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor

- complex with implications for catalysis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35071009>
- Sampson, V. B., Rong, N. H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N. J., Dunn, S. P., & Krueger, L. J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Research*.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2462>
- Saris, C. J., Domen, J., & Berns, A. (1991). The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *The EMBO Journal*, 10(3), 655–664. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07994.x>
- Scheffer, U., Strick, A., Ludwig, V., Peter, S., Kalden, E., & Göbel, M. W. (2005). Metal-free catalysts for the hydrolysis of RNA derived from guanidines, 2-aminopyridines, and 2-aminobenzimidazoles. *Journal of the American Chemical Society*.
<https://doi.org/10.1021/ja0443934>
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O. (1953). STUDIES ON THE PROPAGATION IN VITRO OF POLIOMYELITIS VIRUSES. *The Journal of Experimental Medicine*.
<https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>
- Schoch, K. M., & Miller, T. M. (2017). Antisense Oligonucleotides: Translation from Mouse Models to Human Neurodegenerative Diseases. In *Neuron*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.010>
- Schultz, J., Lorenz, P., Gross, G., Ibrahim, S., & Kunz, M. (2008). MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.45>
- Setten, R. L., Rossi, J. J., & Han, S. ping. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. In *Nature Reviews Drug Discovery*.
<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
- Shah, N., Pang, B., Yeoh, K. G., Thorn, S., Chen, C. S., Lilly, M. B., & Salto-Tellez, M. (2008). Potential roles for the PIM1 kinase in human cancer - A molecular and therapeutic appraisal. *European Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.06.044>
- Shay, K. P., Wang, Z., Xing, P. X., McKenzie, I. F. C., & Magnuson, N. S. (2005). Pim-1 kinase stability is regulated by heat shock proteins and the ubiquitin-proteasome pathway. *Molecular Cancer Research*, 3(3), 170–181. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-04-0192>
- Shell, S., Park, S. M., Radjabi, A. R., Schickel, R., Kistner, E. O., Jewell, D. A., Feig, C., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2007). Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0704372104>
- Shen, X., & Corey, D. R. (2018). Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Research*.

- <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239>
- Simons, R. W., & Kleckner, N. (1983). Translational control of IS10 transposition. *Cell*.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90401-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90401-4)
- Singh, A., Manjunath, L. E., Kundu, P., Sahoo, S., Das, A., Suma, H. R., Fox, P. L., & Eswarappa, S. M. (2019). Let-7a-regulated translational readthrough of mammalian AGO 1 generates a micro RNA pathway inhibitor . *The EMBO Journal*.
<https://doi.org/10.15252/emboj.2018100727>
- Sledz, C. A., Holko, M., De Veer, M. J., Silverman, R. H., & Williams, B. R. G. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1038/ncb1038>
- Smith, J., Ariga, K., & Anslyn, E. V. (1993). Enhanced Imidazole-Catalyzed RNA Cleavage Induced by a Bis-Alkylguanidinium Receptor. *Journal of the American Chemical Society*.
<https://doi.org/10.1021/ja00054a062>
- Sokolova, V., Fiorino, A., Zoni, E., Crippa, E., Reid, J. F., Gariboldi, M., & Pierotti, M. A. (2015). The Effects of miR-20a on p21: Two Mechanisms Blocking Growth Arrest in TGF- β -Responsive Colon Carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25051>
- Soni, S., Anand, P., & Padwad, Y. S. (2019). MAPKAPK2: The master regulator of RNA-binding proteins modulates transcript stability and tumor progression. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1115-1>
- Sun, H., Ding, C., Zhang, H., & Gao, J. (2016). Let-7 miRNAs sensitize breast cancer stem cells to radiation-induced repression through inhibition of the cyclin D1/Akt1/Wnt1 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5656>
- Suresh, G., & Priyakumar, U. D. (2013). Structures, dynamics, and stabilities of fully modified locked nucleic acid (β -D-LNA and α -L-LNA) duplexes in comparison to pure DNA and RNA duplexes. *Journal of Physical Chemistry B*. <https://doi.org/10.1021/jp4016068>
- Suzuki, H. I., Katsura, A., Yasuda, T., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., & Miyazono, K. (2015). Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3050>
- Suzuki, Y., Holmes, J. B., Cerritelli, S. M., Sakhuja, K., Minczuk, M., Holt, I. J., & Crouch, R. J. (2010). An Upstream Open Reading Frame and the Context of the Two AUG Codons Affect the Abundance of Mitochondrial and Nuclear RNase H1. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00619-10>
- Tanzer, A., & Stadler, P. F. (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.065>
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B., & Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*.

- <https://doi.org/10.1038/nature07299>
- Theo Cuypers, H., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E. R., Boelens, W., van Wezenbeek, P., Melief, C., & Berns, A. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: Integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell*, 37(1), 141–150. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90309-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90309-X)
- Thermo Scientific. (n.d.). Thermo Scientific Dharmacon miRIDIAN microRNA Mimics , Hairpin Inhibitors and Negative Controls. *Horizon Inspired Cell Solutions*.
- Thomas, J. M., Yoon, J. K., & Perrin, D. M. (2009). Investigation of the catalytic mechanism of a synthetic DNAzyme with protein-like functionality: An RNaseA mimic? *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja900125n>
- Thomas, M., Lange-Grünweller, K., Weirauch, U., Gutsch, D., Aigner, A., Grünweller, A., & Hartmann, R. K. (2012). The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.278>
- Thomas, Maren, Lange-Grünweller, K., Dayyoub, E., Bakowsky, U., Weirauch, U., Aigner, A., Hartmann, R. K., & Grünweller, A. (2012). PEI-complexed LNA antiseeds as miRNA inhibitors. *RNA Biology*. <https://doi.org/10.4161/rna.21165>
- Thorne, N., Inglese, J., & Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. In *Chemistry and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.012>
- Tu, M. L., Wang, H. Q., Sun, X. D., Chen, L. J., Peng, X. C., Yuan, Y. H., Li, R. M., Ruan, X. Z., Li, D. S., Xu, Y. J., & Ke, Z. J. (2011). Pim-1 is up-regulated by shear stress and is involved in shear stress-induced proliferation of rat mesenchymal stem cells. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.12.001>
- Tüfekci, K. U., Öner, M. G., Meuwissen, R. L. J., & Genç, Ş. (2014). The role of microRNAs in human diseases. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-748-8_3
- Tursynbay, Y., Zhang, J., Li, Z., Tokay, T., Zhumadilov, Z., Wu, D., & Xie, Y. (2016). Pim-1 kinase as cancer drug target: An update (Review). *Biomedical Reports*, 4(2), 140–146. <https://doi.org/10.3892/br.2015.561>
- Vaklavas, C., Blume, S. W., & Grizzle, W. E. (2017). Translational dysregulation in cancer: Molecular insights and potential clinical applications in biomarker development. In *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00158>
- van Lohuizen, M., Verbeek, S., Krimpenfort, P., Domen, J., Saris, C., Radaszkiewicz, T., & Berns, A. (1989). Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: Cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90589-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90589-8)
- van Zalen, S., Lombardi, A. A., Jeschke, G. R., Hexner, E. O., & Russell, J. E. (2015). AUF-1 and

- YB-1 independently regulate β -globin mRNA in developing erythroid cells through interactions with poly(A)-binding protein. *Mechanisms of Development*.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.02.003>
- Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>
- Vaz, C., Ahmad, H. M., Sharma, P., Gupta, R., Kumar, L., Kulshreshtha, R., & Bhattacharya, A. (2010). Analysis of microRNA transcriptome by deep sequencing of small RNA libraries of peripheral blood. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-288>
- Verbeek, S., van Lohuizen, M., van der Valk, M., Domen, J., Kraal, G., & Berns, A. (1991). Mice bearing the E mu-myc and E mu-pim-1 transgenes develop pre-B-cell leukemia prenatally. *Molecular and Cellular Biology*, 11(2), 1176–1179.
<https://doi.org/10.1128/mcb.11.2.1176>
- Verheijen, J. C., Deiman, B. A. L. M., Yeheskiely, E., van der Marel, G. A., & van Boom, J. H. (2000). Efficient Hydrolysis of RNA by a PNA – Diethylenetriamine Adduct. *Angewandte Chemie*. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-3757\(20000117\)112:2<377::aid-ange377>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-3757(20000117)112:2<377::aid-ange377>3.0.co;2-3)
- Wang, J., Anderson, P. D., Luo, W., Gius, D., Roh, M., & Abdulkadir, S. A. (2012). Pim1 kinase is required to maintain tumorigenicity in MYC-expressing prostate cancer cells. *Oncogene*, 31(14), 1794–1803. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.371>
- Wang, M., Gu, H., Qian, H., Zhu, W., Zhao, C., Zhang, X., Tao, Y., Zhang, L., & Xu, W. (2013). MiR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation. *European Journal of Cancer*.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.017>
- Wang, S., Cao, Z., Xue, J., Li, H., Jiang, W., Cheng, Y., Li, G., & Zhang, X. (2017). A positive feedback loop between Pim-1 kinase and HBP1 transcription factor contributes to hydrogen peroxide-induced premature senescence and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.768101>
- Wang, Yanli, Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2008). Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature07315>
- Wang, Yu, Lu, Y., Toh, S. T., Sung, W. K., Tan, P., Chow, P., Chung, A. Y. F., Jooi, L. L. P., & Lee, C. G. L. (2010). Lethal-7 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and targets signal transducer and activator of transcription 3. *Journal of Hepatology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.043>
- Wang, Z., Bhattacharya, N., Weaver, M., Petersen, K., Meyer, M., Gapter, L., & Magnuson, N. S. (2001). Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. In *Journal of veterinary science (Suwon-si, Korea)*.

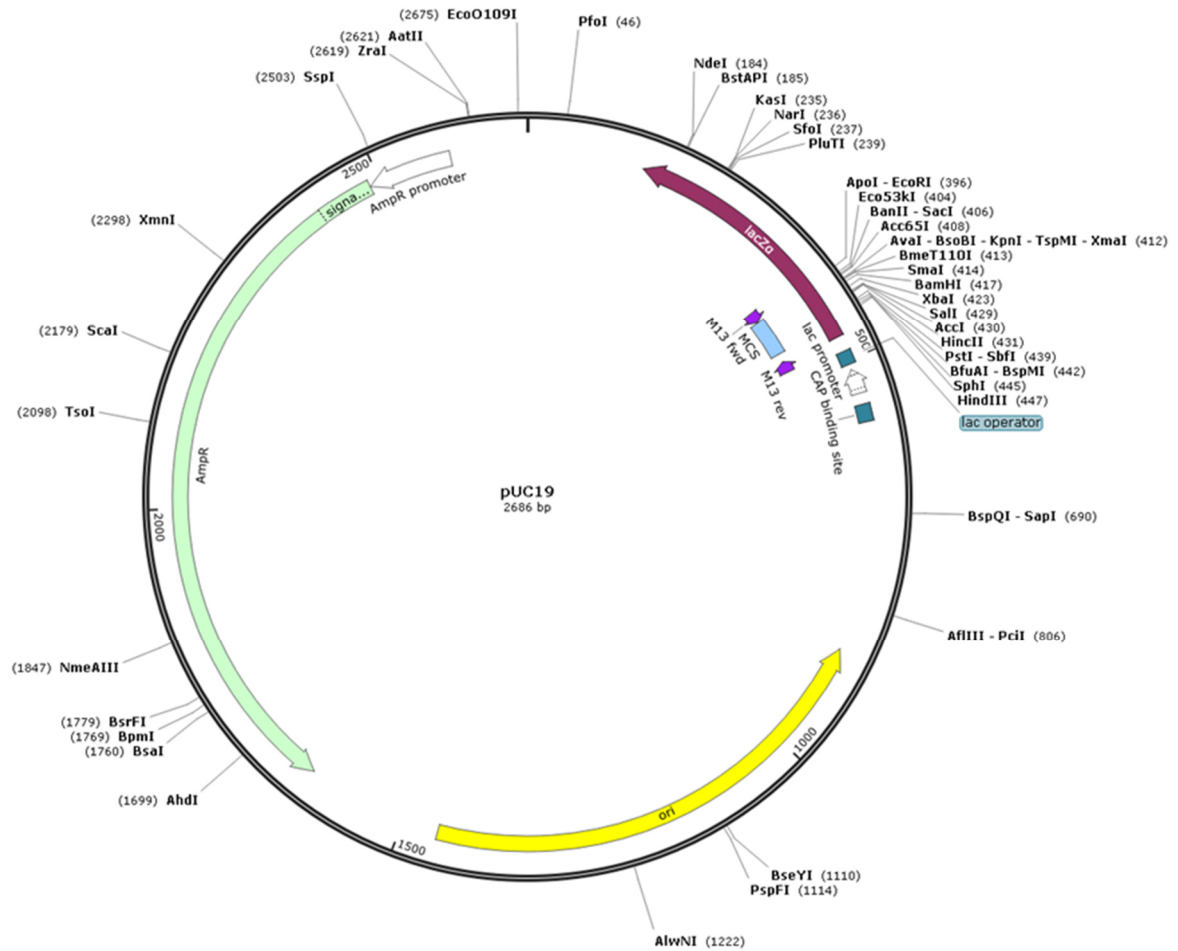
- <https://doi.org/10.4142/jvs.2001.2.3.167>
- Wang, Zeping, Bhattacharya, N., Mixter, P. F., Wei, W., Sedivy, J., & Magnuson, N. S. (2002). Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1593(1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00347-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00347-6)
- Weirauch, U., Beckmann, N., Thomas, M., Grünweller, A., Huber, K., Bracher, F., Hartmann, R. K., & Aigner, A. (2013). Functional role and therapeutic potential of the Pim-1 kinase in colon carcinoma. *Neoplasia (United States)*, 15(7), 783–794. <https://doi.org/10.1593/neo.13172>
- Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Accounts of Chemical Research*. <https://doi.org/10.1021/ar980051p>
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Wingett, D., Reeves, R., & Magnuson, N. S. (1991). Stability changes in pim-1 proto-oncogene mRNA after mitogen stimulation of normal lymphocytes. *Journal of Immunology*.
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C. Y. A., Shyu, A. Bin, Müller, M., Gaestel, M., Resch, K., & Holtmann, H. (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.4969>
- Wu, H., Lima, W. F., & Crooke, S. T. (2001). Investigating the Structure of Human RNase H1 by Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009676200>
- Wu, H., Lima, W. F., Zhang, H., Fan, A., Sun, H., & Crooke, S. T. (2004). Determination of the Role of the Human RNase H1 in the Pharmacology of DNA-like Antisense Drugs. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311683200>
- Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M. J., Von Der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., & Larsson, L. G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206145>
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M. Di, Yartseva, V., Šestan, N., & Steitz, J. A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027>
- Xie, Y., Xu, K., Dai, B., Guo, Z., Jiang, T., Chen, H., & Qiu, Y. (2006). The 44kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer

- cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*, 25(1), 70–78.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209058>
- Xie, Yingqiu, Xu, K., Linn, D. E., Yang, X., Guo, Z., Shimelis, H., Nakanishi, T., Ross, D. D., Chen, H., Fazli, L., Gleave, M. E., & Qiu, Y. (2008). The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3349–3356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707773200>
- Yan, K. S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., & Zhou, M. M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature02129>
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G. A., Liu, C. G., Croce, C. M., & Harris, C. C. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.025>
- Yang, S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O’Carroll, D., & Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006432107>
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., & Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1733>
- Zellmann, F., Thomas, L., Scheffer, U., Hartmann, R. K., & Göbel, M. W. (2019). Site-specific cleavage of RNAs derived from the PIM1 3⁰-UTR by a metal-free artificial ribonuclease. *Molecules*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040807>
- Zhang, H., Wang, Y., Dou, J., Guo, Y., He, J., Li, L., Liu, X., Chen, R., Deng, R., Huang, J., Xie, R., Zhao, X., & Yu, J. (2019). Acetylation of AGO2 promotes cancer progression by increasing oncogenic miR-19b biogenesis. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0530-7>
- Zhang, X., Song, M., Kundu, J. K., Lee, M.-H., & Liu, Z.-Z. (2018). PIM Kinase as an Executional Target in Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 23(3), 109–116. <https://doi.org/10.15430/jcp.2018.23.3.109>
- Zhang, Y., Wang, Z., & Magnuson, N. S. (2007). Pim-1 kinase-dependent phosphorylation of p21Cip1/WAF1 regulates its stability and cellular localization in H1299 cells. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0388>
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., & Hung, M. C. (2001). Cytoplasmic localization of p21 CIP1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/35060032>

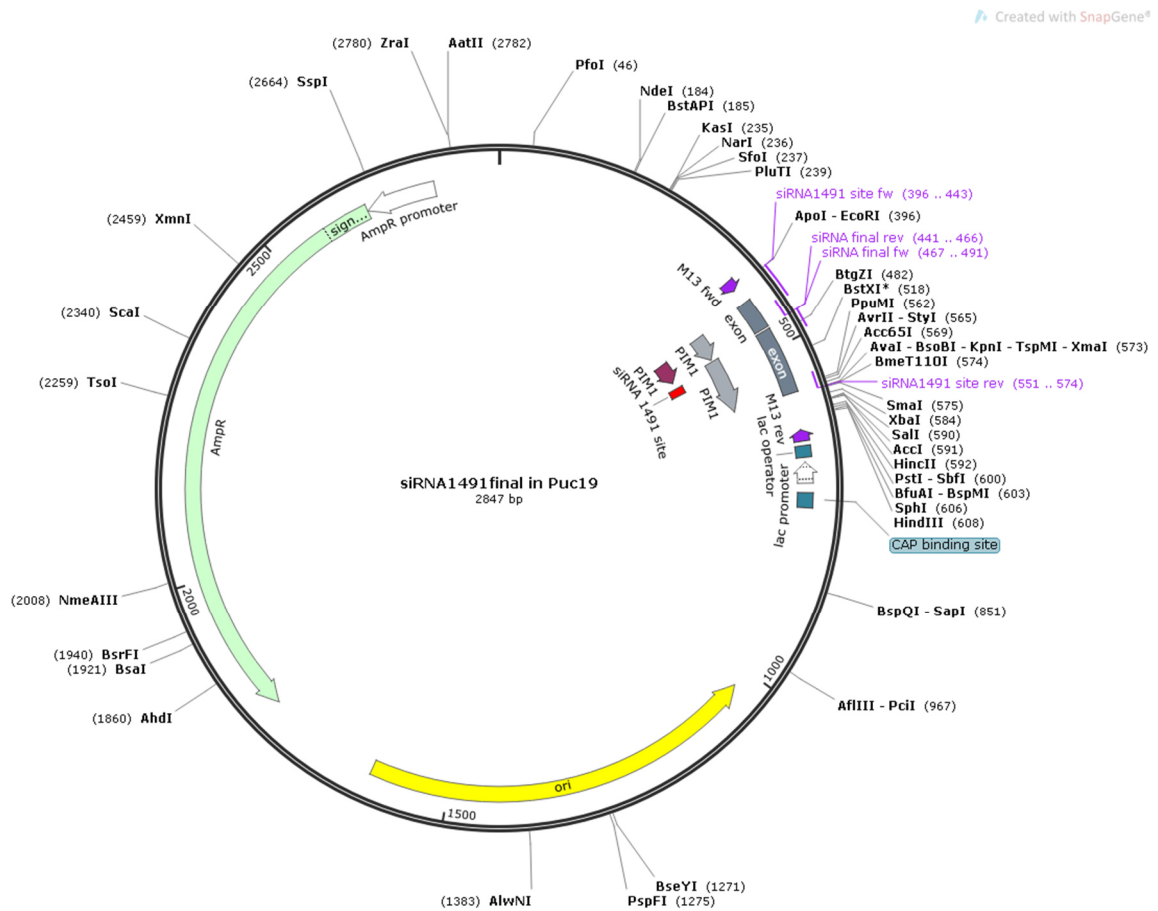
5. ANHANG

5.1. PLASMIDKARTEN

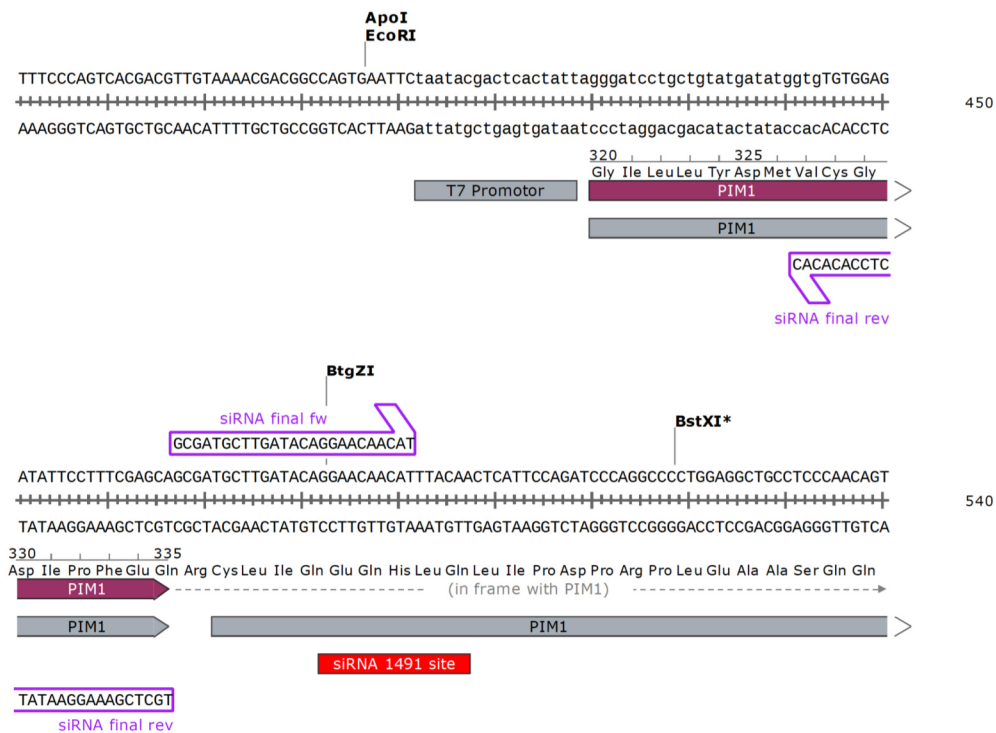
pUC19 Vektor:

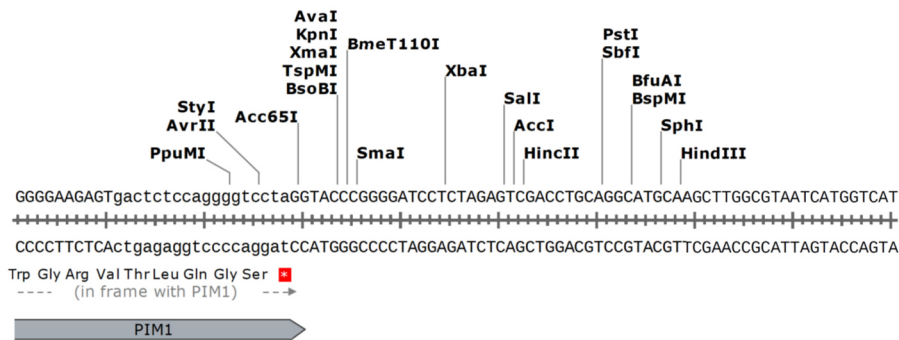


pUC19 mit klonierter *PIM1* mRNA Sequenz für das 155-mer Substrat:



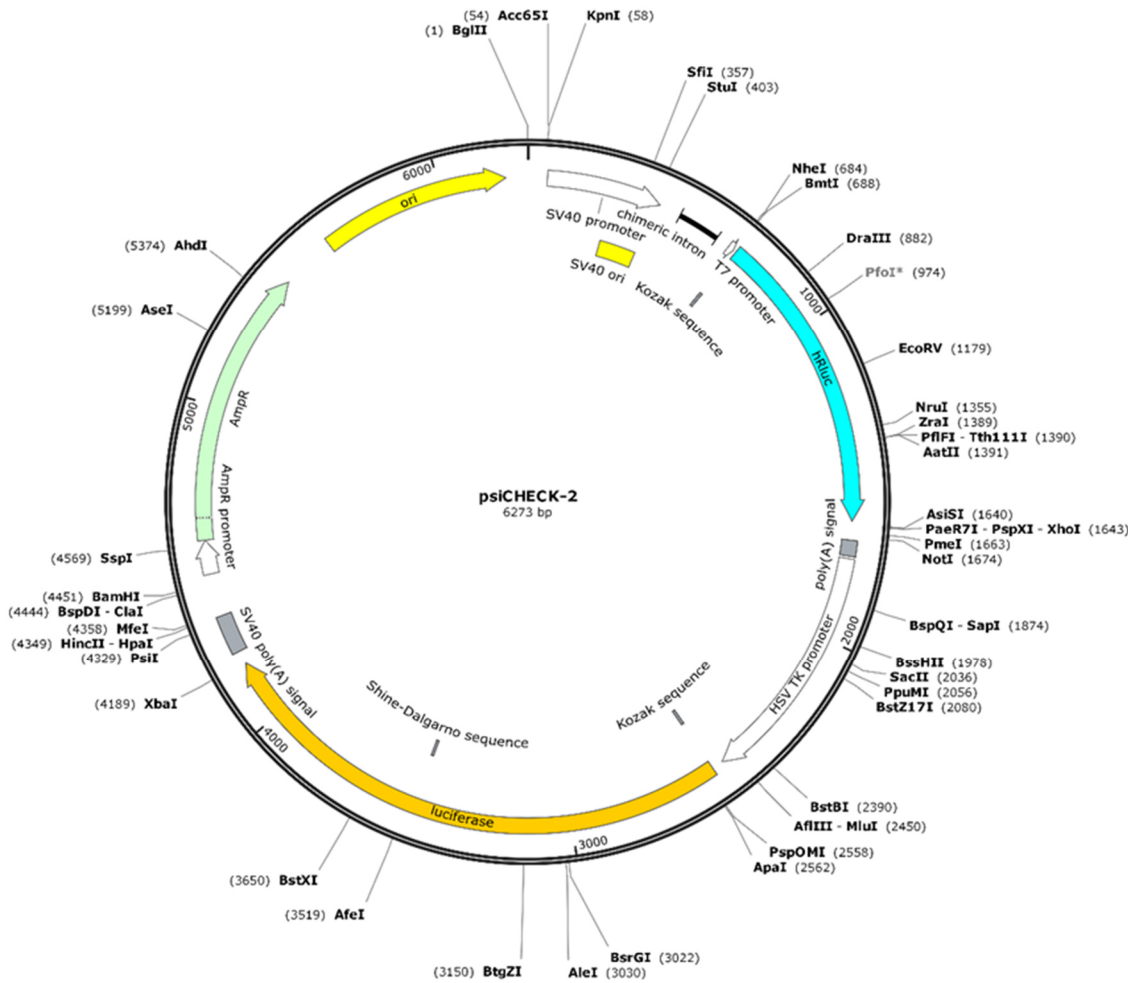
Sequenz mit angezeigten Primern des zweiten Klonierungsschritts:





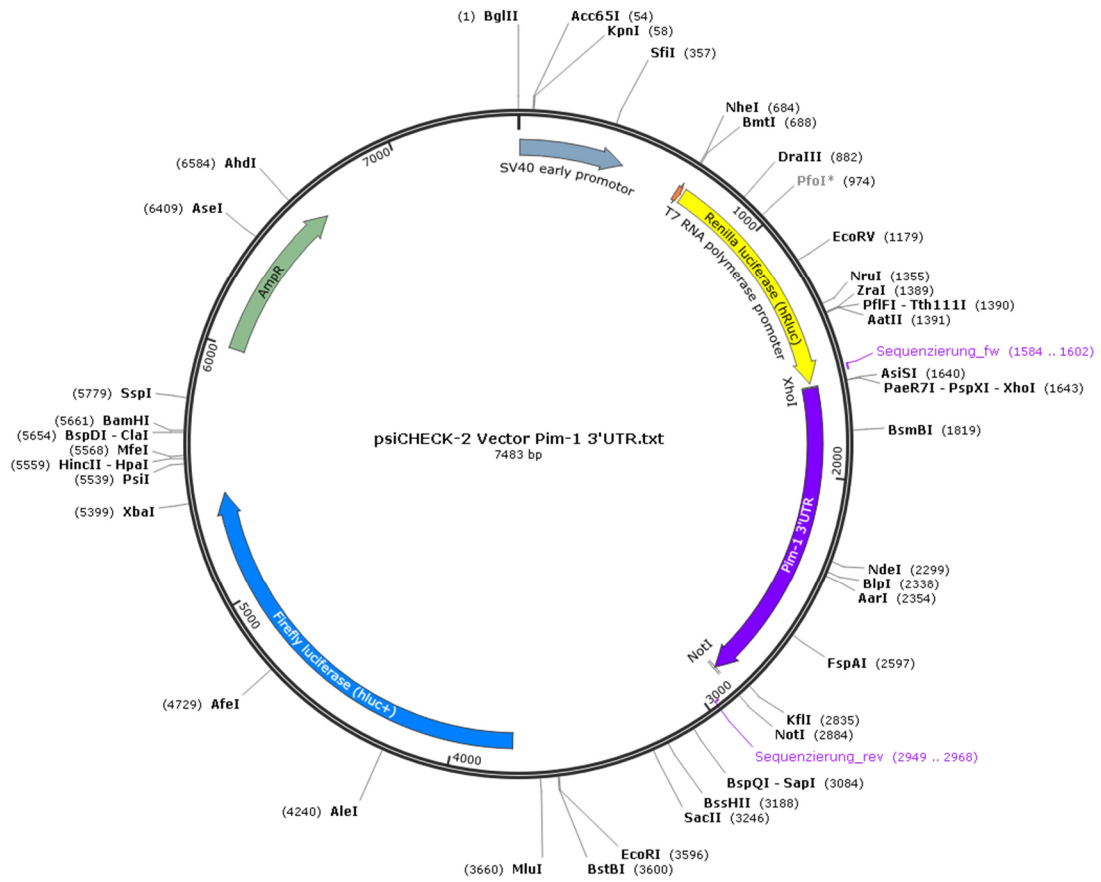
630

psiCHECK2™ Plasmid:



psiCHECK2™ Plasmid mit eingefügter 3'-UTR der *PIM1* mRNA:

Created with SnapGene®



Rot: Bindestelle der siRNA1491

5.3. WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

❖ Publikationen

2020:

Bolz, M., **Thomas, L.**, Scheffer, U., Kalden, E., Hartmann, R.K. and Göbel, M.W. (2020), Redirection of miRNA-Argonaute Complexes to Specific Target Sites by Synthetic Adaptor Molecules. Chem. Biodiversity 17 , e2000272

2019:

Kellershohn, J., **Thomas, L.**, Grünweller, A., Hartmann, R.K., Hardt, M., Vilcinskas, A., Grevelding, C.G., Haeberlein, S. (2019) Insects in anthelmintics research: lady beetle-derived harmonine affects survival, reproduction and stem cell proliferation of *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl. Trop. Dis. 13(3):e0007240

Zellmann, F.; **Thomas, L.**; Scheffer, U.; Hartmann, R. K.; Göbel, M. W. (2019). Site-Specific Cleavage of RNAs Derived from the PIM1 3'-UTR by a Metal-Free Artificial Ribonuclease. Molecules 24, 807

❖ Poster Präsentationen

2018:

RNA Biochemistry Meeting 2018 & Workshop 'Synthetic RNA Biology'
CjD Haus, Bonn „**LNA-based antisense oligonucleotides conjugates to a synthetic chemical nuclease targeting mRNAs**“

2017:

Keystonesymposia „Noncoding RNAs: From Disease to Targeted Therapeutics“
Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada „**LNA-based antisense chemical nuclease conjugates targeting miRNAs and mRNAs in cancer therapy**“

❖ Vorträge

2019:

„Non-coding RNAs“ Hirscheegg Meeting 2019 Marburger Haus, Hirscheegg
Site-Specific Cleavage of *PIM1* 3'-UTR by a Metal-Free Artificial Ribonuclease

2017:

„Non-coding RNAs“ Hirscheegg Meeting 2017 Marburger Haus, Hirscheegg
LNA-based antisense strategies targeting miRNAs and mRNAs

5.4. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Inaktivierung von mRNAs und miRNAs durch DNA/LNA-basierte und mit zusätzlichen Funktionalitäten konjugierte Antisense-Oligonukleotide“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Siegen, den 09.06.2020

.....

(Laura Thomas)